

Mecanismos implicados en la colonización y la epidemicidad del clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15

Eva Gato Corral

Tesis doctoral
2021

Directores: Dr. Germán Bou Arévalo y Dra. Astrid Pérez Gómez
Tutor: Germán Bou Arévalo

Programa de doctorado en Biología Celular y Molecular

Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)-Hospital Universitario
A Coruña (HUAC)-Universidad de A Coruña(UDC)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Los directores de esta Tesis Doctoral, el **Dr. Germán Bou Arévalo**, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe de Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) y profesor asociado de la Universidad de Santiago de Compostela y la **Dra. Astrid Pérez Gómez**, Doctora en Biología por la Universidad de A Coruña e Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

CERTIFICAN:

Que Dña. Eva Gato Corral, Licenciada en Biología por la Universidad de Oviedo, ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC) y en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), bajo su dirección y tutela, el trabajo “**Mecanismos implicados en la colonización y la epidemicidad del clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15**”, el cual, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, Julio del 2021.

Dr. Germán Bou Arévalo

Director/Tutor

Dra. Astrid Pérez Gómez

Directora

A meus pais.

AGRADECIMIENTOS.

Dous proxectos de Tese fallidos despois... parece que a terceira vai a vencida. Así que, aquí estamos, escribindo os agradecementos. Durante estes anos pensei moitas veces que este momento non ía chegar nunca, pero teño a gran sorte de estar rodeada de persoas marabillosas que sempre estiveron dispostas a axudarme, apoiarme e animarme a seguir. Teño tanto que agradecer que necesitaría una Tese por fascículos e, obviamente, un so para dar as gracias, pero bueno, vou a intentar ser breve e facelo en formato .zip, ou non...

En primeiro lugar quero darlle as gracias os meus directores de Tese. Germán, moitísimas gracias por darme a oportunidade de formar parte de este gran equipo de investigadores, pola confianza depositada en min durante estes anos e por sempre ter “cinco minutos”. É unha sorte poder aprender de alguén que sabe tanto. Astrid, ¿a ti que che vou a dicir? Que a pesar dos miles de microinfartos que me fas ter continuamente, adoro ir apagando os teus mecheros polo laboratorio, e por suposto, adoro moito mais que sexas a miña directora de Tese e sobre todo, a miña amiga. Sobra dicir que es unha científica excelente e que aínda que sempre que me corrixa os “papers” ou a mesma “Tesi” sexa todo vermello, espero algún día poder facelo eu a metade de ben que ti. Gracias por todo.

Tampouco quero deixar pasar esta oportunidade para agradecerlle a Mariki que me dera a oportunidade de iniciarme no mundo da Investigación, porque de non ser así, hoxe non estaría a punto de defender esta Tese.

Agora vou a continuar con todas esas personiñas do labo, que foron moito mais que compañeiros, converténdose moitos deles en amigos. Aprendín cousas de todos e cada un de vos, porque sodes uns científicos increíbles.

Sin galletas, con vosoutros empezou todo. Antes de ler todo isto imaxínade que aquí vai unha foto da boda de Alex e xa pouco quedará que dicir. Charlito, parece que foi onte cando cheguei o INIBIC e alí estabas ti, levantando unha ceja e mirando con cara de rancio, menos mal que co primeiro “chivatazo” te deches conta de que era peligrosa e te uniches o meu equipo. Mariló, despois chegaches ti e sen necesidade de articular moitas palabras xa te convertiches na terceira en discordia e a día de hoxe xa non nos fan falla nin palabras para entendernos, ademais, para “hablar mucho” xa estou eu. Que sigamos dando paseños e indo a todos os concertos de Izal, ou polo menos comprando as entradas. Un besito Mariló (dos do Delirium, eh!). Gracias por todo galletiñas, que non é pouco.

Patri, seguro que aínda segues pensando nesa mirada que che botei o primeiro día, da cal no me acordo, pero eu sigo pensando na sorte que tivemos de que apareceras por aquí, na túa risa contaxiosa e no ben que se nos daba facer “snow”, bueno, ou mais ben facer “cú”. Gracias por todo.

Martiña, ti apareciches polo INIBIC cando eu xa estaba a punto de subir, pero alegráchesnos a vida. Adoreite desde o momento un, con esa caraña de por favor, que alguén me traduza o que di Alex, esas ganas de pipetear sen punta, ou a túa boa intención de prender lume o INIBIC e nos deixara unha historia para toda a vida. Gracias por sempre estar disposta a botar unha man e por suposto, por ese “Resacón en Bruselas”.

Sorayito, en honor a ti vou enumerar as cousas que che quero dicir. En primeiro lugar, que sepas que da gusto traballar contigo, en segundo lugar, é xenial sempre ter unha Soripedia a que preguntarlle calquera duda e que che conteste en milésimas de segundo (bueno, isto se non é vía Whatsapp, ahí o servizo demorase un pouco), e en terceiro, que de nada por ese 6 de outubro de 2018. Gracias por todo Sorayito.

Lau, estouche escribindo con dobre alegría porque ademais de estar de volta e non comerte ningún tiburón, cousa que pasei dous anos temendo, volves sendo todo amor. O malo é que agora unha pandemia mundial é a que non me permite darche moreas de abrazos e bicos, pero bueno, nalgún momento será. Gracias por tantos momentos, dende aprender a “secuenciar” en Mannheim, as horas no ximansio, ou as tardes/noites de cañas dentro do territorio acotado polo pastor. Gracias golfi.

Meri, María José e Silvia, canto se vos vota de menos no laboratorio. Merinius, gracias a ti fun capaz de facer o primeiro KO, o resto da historia xa a sabes. É un pracer compartir contigo o título das mais finas e delicadas do laboratorio. O teu sentido do humor faite tremendamente especial. Gracias, Merinius. MJ, amiguiña, que tempos aqueles nos que compartiamos sabiduría alí nas portas da metade do pasillo, ya tu sabes. Gracias por estar sempre, para todo, a calquer hora. Silvia, aínda non coñeceín a ningunha persoa con esa constancia, tesme abraiada. Gracias pola túa creatividade, por ser tan detallista e por ensinarme que con esforzo as cousas conséguense.

Anita, eres a dulzura personificada, e encántame cando che dan os ataques de sinceridade, así, sin anestesia. Gracias por ser tan ti.

Keliña, contigo chegou “la Rosalía” o laboratorio. Porque aínda que as veces cortocircuito co sumamente señora que me fas sentir, é xenial saír de festa é ver unha mini Astrid versión TikTok. Gracias polo soplo de aire fresco, e por suposto, por esa lista de reprodución, trá trá.

JuanCar, meu compañeiro de fatiga nesta recta final, es un currante, mereceste todo o mellor. Elixas o que elixas, ben elixido estará. Gracias por todo o que me axudas. Seguiremos intercambiando información de todo tipo vía Whatsapp.

Cris, gracias por sempre ter un “ajah”, que aínda que case son insonoros, faste oír.

Paula, gracias por nunca dicir que non a ningún traballo dos que che propoño facer.

Víctor, compartín a alegría de ese dobre KO no medio da cuarentena como se fose meu, gracias por ser un compañeiro xenial nese tempo que compartimos no INIBIC.

Jorge, aínda que o meu instinto asesino asoma cada vez que te sentas a facer cousas na poyata, o final fas unha gracia das túas e libráste. Aínda así, gracias por ser o meu “Pubmed” das resistencias, tantas cousas caben nesa cabeciña.

Bruno, que cabeciña a túa, tantas ideas, e por suposto, canta axuda. Gracias por ensinarme as cousiñas máis básicas de Linux e por todas esas charlas científicas ata as tantas no labo e fora, e as que nos quedan...

Marina, que pracer compartir esta recta final. Todo o que sei a día de hoxe do Maldi é gracias a ti, así que solo podo agradecerche que confiases en min para formar parte de este equipazo. Gracias.

Alexito, que te pires! Aínda que te odio cada vez que volves de vacacións na túa caravana, o final... cólleseche cariño! Que sigas nadando en “papers”, ti e toda a xente que se atopa contigo, porque estaslle regalando a posibilidade de decidir que facer a partir de aquí. Gracias, porque por suposto, aprendín moitas cousas de ti.

Marga gracias por acollerme na familia “Codis” e por ser tan humana.

Juan, é un pracer traballar contigo codo con codo, algún día ABAC verá a luz. Gracias pola Juanipedia, que igual que a Soripedia, sempre está dispoñible para compartir a súa sabiduría.

Miriam, gracias por sempre escoitarme, axudarme e darme os teus mellores consellos. Transmites moita paz.

Clarita, gracias por interesarte sempre por como vai todo e por apuntarte a un bombadeo.

Mohammed, trouxeches alegría a este laboratorio, gracias por esos “See you maniana” e esas cancións de perreo jordano.

Noelia, a detective das augas residuais, gracias pola colaboración nesa lista de reprodución, ti, Keliña e Mohhamed menudos Dj’s.

Bego, gracias por ser así, sempre tan preocupada, intentando axudar en todo e por suposto, por eses doces deliciosos que sempre nos traes.

Maricuchi, gracias por estar sempre na sombra repoñendo o material. Es a reina do autoclave e do relleno de puntas.

Antón, Laura F., Lucía, Inés, Olga, seguimos esperando a poder volver a ter unha cea de Nadal, será como xuntar todas as que nos estamos perdendo.

Jose A, Jose, Carmen e demais persoas que pasaron por este labo durante todo este tempo, gracias, aprendín cousas de todos e cada un de vos.

Tamén me gustaría agradecerlle a todas as persoas que forman parte do Servicio de Microbioloxía todos eses sorrisos cada mañá e eses momentos de conversa que compartimos moitas veces, facedes que as largas horas que pasamos aquí sexan moito mais amenas.

A xente do INIBIC coa que pasei moitos e moi bos momentos.

Noe, Lucía, Diana, Patri, Bele, Marcos, gracias por eses ratiños de desconexión que nos fan volver o pasado, como se non pasara o tempo. Sodes parte de min.

Iván e Jose, meus amiguiños da alma, levades toda a vida o meu carón, así que as gracias téñovolas que dar por cada un dos momentos vividos, e por suposto, tamén formades parte desta Tese. Cris, Sandra, Edu, Sabi, Cristian e demais tropa, vos tamén estades incluídos, por suposto. Por seguir tendo as vosas risas de banda sonora da vida,

Porque sigamos brindando sempre xuntos por Nadal e organizando planes sen parar de rir.

Alex, María, Paula, Julia e Alvarito, que marabilla de familia. Miles de gracias por estar sempre ahí, polos ánimos destes últimos días e sobre todo, por facerme madriña do meu amoríño durante o transcurso desta Tese. Adoro cando Julia me pide que lle volva a contar por milésima vez a historia de Marta no laboratorio, ou a escoito contala a ela con toda a emoción, canto se pode chegar a querer a unha ratiña tan pequeniña.

A Fanny, Óscar, Apu, Ana, Silvia, Rubén, Pedrito, Samu, Choche porque... Meirás es lo más e vosoutros tamén.

A Ricardo, Mari Carmen , gracias por ser un segunda familia, por preocuparvos e sempre estar ahí. Alba, gracias por ser como es, por ese concerto de Dani Martín, por compartir o amor polas croquetas (e polas compras), por esa despedida, pola boda, e por suposto, gracias por esa viaxe en taxi a McDonalds. Quérovos.

A meus avós de Cabreiros que ata aínda hai ben pouco meu avó sempre quería que lle contara como ían as investigacións, e miña avoa sempre poñía ese sorriso tan doce o escoitar. Quérovos.

A meus avós de Vilapedre, porque non existe ninguén que me mire cos mesmos ollos cos que me mirades vos, e por suposto non podeades estar mais orgullosos de min. Moito vos quero.

A meus pais, porque todo o que son é gracias a vos. Non me chegará a vida enteira para agradecervos todo o que facedes por min. Gracias por deixarme escoller sempre o que quero facer, aínda que iso implique equivocarme, pero sei que vos sempre estaredes ahí, apoiándome e queréndome, orgullosos de min e de todo o que fago. Canto vos quero.

O resto da miña familia, gracias a todos, sodes parte de min.

A Iván, por ser xa un experto en facer PCRs e sobre todo, por esperar incansablemente por min mentres que non estou no labo. Gracias por aportar a desconexión, que moitas veces tanta falta me fai, e por suposto, por compartir a vida connigo. Algún día regalareiche a “vela” esa do laboratorio que me fai estar calada. Quérote moito.

Espero non esquecerme de ningún, GRACIAS POR TODO, de corazón.
Dádesme a vida.

ÍNDICE

RESUMO.....	19
RESUMEN.	21
ABSTRACT.....	23
ABREVIATURAS.	25
ÍNDICE DE FIGURAS.	27
INTRODUCCIÓN.	31
1. Género <i>Klebsiella</i>.	32
1.1. El patógeno <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
1.2. Estructura poblacional de <i>K. pneumoniae</i>	40
1.3. Clones de alto riesgo de <i>K. pneumoniae</i>	44
1.4. Riesgo de transmisión y brotes en entornos sanitarios.	52
2. Mecanismos de resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.	54
2.1. Resistencia a los β -lactámicos.	56
2.2. Resistencia a ceftazidima-avibactam	60
2.3. Resistencia a los aminoglucósidos.	61
2.4. Resistencia a las quinolonas.	62
2.5. Resistencia a la colistina.	65
2.6. Resistencia a la tigeciclina.	66
3. Patogénesis en <i>Klebsiella pneumoniae</i>.	67
3.1. Cápsula.	68
3.2. Lipopolisacárido.	70
3.3. Sideróforos.	71
3.4. Metabolismo de la alantoína.	73
3.5. Sistemas de secreción.	74

4. Colonización intestinal y estrategias de descolonización.	86
OBJETIVOS.	93
CAPÍTULOS.	99
CAPÍTULO I. Secuenciación del genoma de dos cepas clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de OXA-48 aisladas durante un gran brote en España.	99
CAPÍTULO II. Kpi, un sistema chperona-usher pili asociado al clon de alto riesgo <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST15 ampliamente diseminado por todo el mundo.	103
CAPÍTULO III. Rasgos genómicos que promueven la diseminación y la persistencia del clon de alto riesgo <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST15 productor de OXA-48 en España.	129
CAPÍTULO IV. Actividad antiadhesiva de un extracto polifenólico de <i>Vaccinium corymbosum</i> dirigido a la colonización intestinal causada por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	165
DISCUSIÓN.	177
CONCLUSIONES.	197
BIBLIOGRAFÍA.	203
CVA.	255

RESUMO.

Klebsiella pneumoniae ST15 é un clon de alto risco con unha gran plasticidade xenética e portador dunha gran diversidade de xenes de resistencia a antimicrobianos. Está implicado na produción de gromos hospitalarios en todo o mundo e posúe unha gran capacidade para colonizar o tracto gastrointestinal, o que supón un factor de risco importante para o posterior desenvolvemento dunha infección.

Esta Tesis Doctoral aborda o estudo dos mecanismos implicados na patoxénese de *K. pneumoniae* ST15 co obxectivo de buscar novas dianas terapéuticas e estratexias alternativas para o manexo das infeccións causadas por este clon de alto risco. Para iso utilizamos como modelo un clon epidémico de *K. pneumoniae* ST15 illado durante un gran gromo producido no Hospital Universitario de A Coruña.

A análise comparativa do seu xenoma fronte a outros clons pertencentes a diferentes STs de *K. pneumoniae* permitiunos identificar as características xenómicas específicas deste clon que poderían estar implicadas no seu éxito como patóxeno.

Encontramos que o clon ST15 posúe dous factores de virulencia relacionados coa adherencia que non están presentes no resto de STs analizados.

Identificáronse e caracterizáronse por primeira vez en *K. pneumoniae* un sistema de tipo chaperona-usher pili, o sistema Kpi, e un sistema de secreción de dous compoñentes, o sistema FhaB/FhaC. Estes sistemas están directamente relacionados co fenotipo altamente adherente mostrado polo clon epidémico ST15, xa que están implicados na capacidade de este clon para adherirse a diferentes células eucariotas e formar *biofilm*. Ademais, os sistemas Kpi e FhaB/FhaC están estreitamente relacionados con este ST e confírenlle unha maior eficacia biolóxica.

Por outro lado, demostrouse que o sistema Kpi ten un papel determinante tanto na habilidade mostrada por este clon epidémico para colonizar o tracto gastrointestinal nun modelo murino de colonización, como no seu potencial patoxénico nun modelo de infección en *Galleria mellonella*.

Tendo en conta que os dous sistemas caracterizados neste estudio están claramente asociados co clon de alto risco ST15, estes poden considerarse biomarcadores óptimos para identificar este clon de maneira específica. Neste contexto, ambos sistemas poderían ser usados como diana para detectar *K. pneumoniae* ST15 con unha alta sensibilidade e especificidade.

Finalmente, obtivemos e caracterizamos un extracto salino de *Vaccinium corymbosum* con un alto contido en polifenois. Este extracto inhibe a adhesión a células eucariotas intestinais e a formación de *biofilm* na cepa Kp3380. O efecto anti-adherente producido por este extracto reduce significativamente a colonización intestinal producida por *K. pneumoniae* nun modelo murino.

RESUMEN.

Klebsiella pneumoniae ST15 es un clon de alto riesgo con una gran plasticidad genética y portador de una gran diversidad de genes de resistencia a antimicrobianos. Está implicado en la producción de brotes hospitalarios en todo el mundo y posee una gran capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal, lo que supone un factor de riesgo importante para el posterior desarrollo de una infección.

Esta Tesis Doctoral aborda el estudio de los mecanismos implicados en la patogénesis de *K. pneumoniae* ST15 con el objetivo de buscar nuevas dianas terapéuticas y estrategias alternativas para el manejo de las infecciones causadas por este clon de alto riesgo. Para ello utilizamos como modelo un clon epidémico de *K. pneumoniae* ST15 aislado durante un gran brote producido en el Hospital Universitario de A Coruña.

El análisis comparativo de su genoma frente a otros clones pertenecientes a diferentes STs de *K. pneumoniae* nos permitió identificar las características genómicas específicas de este clon que podrían estar implicadas en su éxito como patógeno.

Encontramos que el clon ST15 posee dos factores de virulencia relacionados con la adherencia que no están presentes en el resto de STs analizados.

Se han identificado y caracterizado por primera vez en *K. pneumoniae* un sistema tipo chaperona-usher pili, el sistema Kpi, y un sistema de secreción de dos componentes, el sistema FhaB/FhaC. Estos sistemas están directamente relacionados con el fenotipo altamente adherente mostrado por el clon epidémico ST15, ya que están implicados en la capacidad de este clon para adherirse a diferentes células eucariotas y formar *biofilm*. Además, los sistemas Kpi y FhaB/FhaC están estrechamente relacionados con este ST y le confieren una mayor eficacia biológica.

Por otra parte, se ha demostrado que el sistema Kpi tiene un papel determinante tanto en la habilidad mostrada por este clon epidémico para colonizar el tracto gastrointestinal en un modelo murino de colonización, como en su potencial patogénico en un modelo de infección en *Galleria mellonella*.

Teniendo en cuenta que los dos sistemas caracterizados en este estudio están claramente asociados con el clon de alto riesgo ST15, estos pueden considerarse biomarcadores óptimos para identificar este clon de manera específica. En este contexto, ambos sistemas podrían ser usados como diana para detectar *K. pneumoniae* ST15 con una alta sensibilidad y especificidad.

Finalmente, hemos obtenido y caracterizado un extracto salino de *Vaccinium corymbosum* con un alto contenido en polifenoles. Este extracto inhibe la adhesión a células eucariotas intestinales y la formación de *biofilm* en la cepa Kp3380. El efecto anti-adherente producido por este extracto reduce significativamente la colonización intestinal producida por *K. pneumoniae* en un modelo murino.

ABSTRACT.

Klebsiella pneumoniae ST15 is a high-risk clone with high genetic plasticity carrying a wide diversity of antimicrobial resistance genes. It is implicated in the production of hospital outbreaks worldwide and it has a high capacity to colonize the gastrointestinal tract, which is a major risk factor for the subsequent development of an infection.

This Doctoral Thesis deals with the study of the mechanisms involved in the pathogenesis of *K. pneumoniae* ST15 with the aim of searching for new therapeutic targets and alternative strategies for the management of infections caused by this high-risk clone. For this purpose, we used as a model an epidemic clone of *K. pneumoniae* ST15 isolated during a large outbreak at the University Hospital of A Coruña.

Comparative analysis of its genome against other clones belonging to different *K. pneumoniae* STs allowed us to identify specific genomic features of this clone that could be involved in its success as a pathogen.

We found that clone ST15 possesses two virulence factors related to adherence that are not present in the rest of the STs analysed.

A chaperone-usher pili system, the Kpi system, and a two-component secretion system, the FhaB/FhaC system, have been identified and characterized for the first time in *K. pneumoniae*. These systems are directly related to the highly adherent phenotype displayed by the epidemic clone ST15, as they are involved in the ability of this clone to adhere to different eukaryotic cells and form biofilm. In addition, the Kpi and FhaB/FhaC systems are closely related to this ST and confer greater fitness.

On the other hand, it has been demonstrated that the Kpi system has a determining role both in the ability shown by this epidemic clone to colonize the

gastrointestinal tract in a murine model of colonization, and in its pathogenic potential in a model of infection in *Galleria mellonella*.

Considering that the two systems characterized in this study are clearly associated with the high-risk clone ST15, they can be considered optimal biomarkers to identify this clone specifically. In this context, both systems could be used as targets to detect *K. pneumoniae* ST15 with high sensitivity and specificity.

Finally, we have obtained and characterized a saline extract of *Vaccinium corymbosum* with a high polyphenol content. This extract inhibits intestinal eukaryotic cell adhesion and biofilm formation in the strain Kp3380. The antiadhesive effect produced by this extract significantly reduces intestinal colonization by *K. pneumoniae* in a murine model.

ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
CAZ/AVI	Ceftazidima/Avibactam
CG	Grupos clonales (<i>clonal groups</i>)
cgMLST	Tipificación multilocus de secuencias del genoma principal (<i>core genome Multi-locus Sequence Typing</i>)
cKp	<i>K. pneumoniae</i> clásica (<i>classic K. pneumoniae</i>)
CPKp	<i>K. pneumoniae</i> productora de carbapenemasas (<i>carbapenem producing Klebsiella pneumoniae</i>)
CRKp	<i>K. pneumoniae</i> resistente a los carbapenémicos (<i>carbapenem resistant K. pneumoniae</i>)
CUP	Chaperona-usher pili (<i>chaperone-usher pili</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ERC	Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos
ESCMID	Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HRC	Clones de alto riesgo (<i>high risk clone</i>)
hvKp	<i>K. pneumoniae</i> hipervirulenta (hipervirulent <i>K. pneumoniae</i>)

ICE	Elemento conjugativo integradore (<i>integrative conjugative element</i>)
IDSA	Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (<i>Infectious Diseases Society of America</i>)
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry
LPS	Lipopolisacáridos
MDR	Multirresistente (<i>multidrug-resistant</i>)
mHBSS	Solución salina equilibrada de Hank modificada (<i>modified Hank's balanced salt solution</i>)
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (<i>Multi-locus sequence typing</i>)
MSAT	Sistema de temperatura ambiente a media escala (<i>medium scale ambient temperature system</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
RQMP	Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos
ST	Secuencia tipo (<i>sequence type</i>)
T5SS	Sistemas de secreción de tipo V (<i>type V secretion system</i>)
T6SS	Sistemas de secreción de tipo VI (<i>type VI secretion system</i>)
TMF	Trasplante de microbiota fecal
TPS	Secreción de dos componentes (<i>two partner secretion</i>)
UE	Unión Europea
XDR	Extremadamente resistente (<i>extensively drug-resistant</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Árbol filogenético basado en el genoma completo que muestra la relación entre *K. pneumoniae*, las especies del complejo *K. pneumoniae* (ramas rojas), otros miembros del género *Klebsiella* (ramas negras) y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (ramas grises). *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella ornithinolytica* se les ha asignado el nombre de género *Raoultella* basándose en las secuencias de *gyrB* (1), pero esto se debate porque convierte a *Klebsiella* en no monofilética. Figura adaptada de Wyres K1 y colaboradores, *Nat Rev Microbiol* 18, 344-359 (2020).

Pag. 34

Figura 2. Imagen de microscopía electrónica de barrido de *K. pneumoniae* Kp3380. Imagen tomada a una magnitud 15000x.

Pag. 36

Figura 3. Distribución y frecuencia de las secuencias tipo de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos a nivel mundial (a). Distribución y frecuencia de las secuencias tipo de *K. pneumoniae* resistente a las cefalosporinas de tercera generación y sensibles a los antibióticos carbapenémicos a nivel mundial (b). Figura adaptada de Wyres KL y colaboradores, *Nat Rev Microbiol* 18, 344-359 (2020).

Pag. 47

Figura 4. Principales antimicrobianos utilizados en *K. pneumoniae* (a) y sus mecanismos de acción (b). Wang TZ y colaboradores, *Nat Rev Nephrol*, 15 463-481 (2019).

Pag. 56

Figura 5. Modelo de translocación de los sistemas TPS. ME: membrana externa. Figura adaptada de Thanassi y colaboradores, *Mol Membr Biol*, 22 63-72 (2005).

Pag. 76

Figura 6. Representación esquemática del T6SS y sus distintas subunidades. IM, membrana interna; OM, membrana externa. Figura adaptada de Cherrak Y y colaboradores, *Microbiol Spectr*, 7 (2019).

Pag. 79

Figura 7. Estructura general de los pili de tipo 1 (a) y de tipo P (b). Figura adaptada de Lillington J. y colaboradores, *Biochim Biophys Acta*, 1840 2783-96 (2014).

Pag. 82

Figura 8. Estructura de los distintos sistemas CUP.

Pag. 86

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas son responsables de casi el 30% de los 56 millones de muertes registradas al año en el mundo (2). Representan un grave problema de salud pública debido a la elevada morbilidad, mortalidad y a los costes económicos que suponen para el sistema sanitario. A pesar de los grandes progresos en el conocimiento de la epidemiología, etiología, patología, profilaxis y tratamiento de las enfermedades infecciosas, éstas continúan teniendo una elevada prevalencia.

En febrero de 2017, la OMS publicó una lista con las 12 especies bacterianas más preocupantes y peligrosas para la salud. Esta lista se divide en tres categorías en función de la urgencia en la obtención de nuevos agentes antimicrobianos: prioridad crítica, alta o media. *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los antibióticos carbapenémicos y enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos y a cefalosporinas de tercera generación se engloban dentro de la categoría de prioridad crítica (3).

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos en enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* supone una importante amenaza para los pacientes y para los sistemas sanitarios de todos los países (4,5). Las infecciones por enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (ERC) se asocian a una elevada mortalidad, principalmente debido a los retrasos en la administración de un tratamiento eficaz y a la limitada disponibilidad de opciones terapéuticas. En el caso de *K. pneumoniae* ya se han notificado cepas hipervirulentas y resistentes a los antibióticos carbapenémicos en el continente asiático (6), lo que supone una amenaza adicional con potencial para diseminarse mundialmente.

Existen determinadas cepas de ERC, normalmente portadoras de plásmidos que contienen genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos, que tienen una gran capacidad de diseminación. A estas cepas se las conoce como clones de alto riesgo. El ambiente hospitalario, donde existe una alta presión selectiva por el uso de antibióticos favorece la aparición y diseminación de estos clones de alto riesgo(5).

La importación de ERC entre países, mediante el traslado de pacientes, los grandes brotes regionales y el empeoramiento de la situación epidemiológicas, pone de manifiesto la necesidad de intensificar los esfuerzos para establecer programas de prevención y vigilancia epidemiológica eficaces para controlar la alta diseminación de estos clones (5).

Esta Tesis Doctoral aborda el estudio de los mecanismos implicados en la patogénesis de *K. pneumoniae* ST15 con el objetivo de buscar nuevas dianas terapéuticas y nuevas estrategias para el manejo de las infecciones causadas por este clon de alto riesgo.

1. Género *Klebsiella*.

El género *Klebsiella*, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, al orden *Enterobacteriales* y a la clase *Gammaproteobacterias*. A la familia *Enterobacteriaceae* también pertenecen géneros de gran relevancia clínica como son *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, o *Providencia*. Este género fue nombrado por Trevisan en 1885 en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913). La primera especie de *Klebsiella* descrita fue un bacilo capsulado aislado por Von Frisch de un paciente con rinoscleroma en el año 1882. Trevisan, en 1887, la nombró “*Klebsiella rhinoscleromatis*”. Las bacterias englobadas dentro del género *Klebsiella* son bacilos gram-negativos, no móviles, anaerobios

facultativos, oxidasa-negativos, con forma de varilla y a menudo rodeadas de una prominente cápsula de polisacáridos. Posee un tamaño entre 0,3–1 µm de diámetro y entre 0,6–6 µm de largo, siendo el contenido de guanina y citosina en su ácido desoxirribonucleico (ADN) de entre el 53 % y el 58 % (7).

Actualmente, el género *Klebsiella* engloba 24 especies, 22 de ellas validadas públicamente (<https://www.namesforlife.com/10.1601/tx.3202> ; <https://lpsn.dsmz.de/genus/klebsiella> , último acceso en junio de 2021), siendo *Klebsiella indica* la última especie añadida en abril del año 2020 (8).

Las especies pertenecientes al género *Klebsiella* están presentes de forma ubicua en la naturaleza. Forman parte de la microbiota intestinal de mamíferos y se encuentran en hábitats ambientales como el suelo, superficies acuáticas y plantas (9,10). Sin embargo, al mismo tiempo son una de las causas mas frecuentes de infecciones nosocomiales. Se ha descrito que las muestras ambientales son muy similares a las muestras clínicas en cuanto a sus reacciones bioquímicas y virulencia (11). Este gran parecido entre especies ha dado lugar a que una proporción sustancial de aislamientos fuesen identificados como *K. pneumoniae* mediante ensayos bioquímicos o proteómicos, perteneciendo a otras especies estrechamente relacionadas. Se han definido tres filogrupos distintos de *K. pneumoniae*, KpI, KpII-A, KpII-B y KpIII, en base a la secuenciación de un pequeño número de genes (12,13) designando tres especies distintas: *K. pneumoniae* (KpI), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KpII-A), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KpII-B) (14) y *K. variicola* (KpIII) (15). La secuenciación completa de los genomas ha ayudado a clarificar esto con mayor profundidad, observándose que hay un grupo de especies que comparten una identidad nucleotídica media del 95-96% con *K. pneumoniae* y sólo un 90% de identidad nucleotídica media con otras especies del

género (12,16–18). Este grupo de especies, sin designación taxonómica formal, se denominan complejo *K. pneumoniae*. Los miembros del complejo se distinguieron por primera vez mediante un análisis filogenético a partir de las secuencias de *gyrA* y *parC* (12). Posteriormente, la secuenciación completa de los genomas facilitó la identificación de otras especies miembros (16). Las siete especies que forman el complejo *K. pneumoniae* a día de hoy, y sus correspondientes filogrupos (Kp1-Kp7), están descritos en la figura 1:

- *Klebsiella pneumoniae* (sensu stricto)(Kp1)
- *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2) (14)
- *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* (Kp3) (15)
- *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4) (14)
- *Klebsiella variicola* subsp. *tropicalensis* (Kp5) (19)
- *Klebsiella quasivariicola* (Kp6) (20)
- *Klebsiella africanensis* (Kp7) (19)

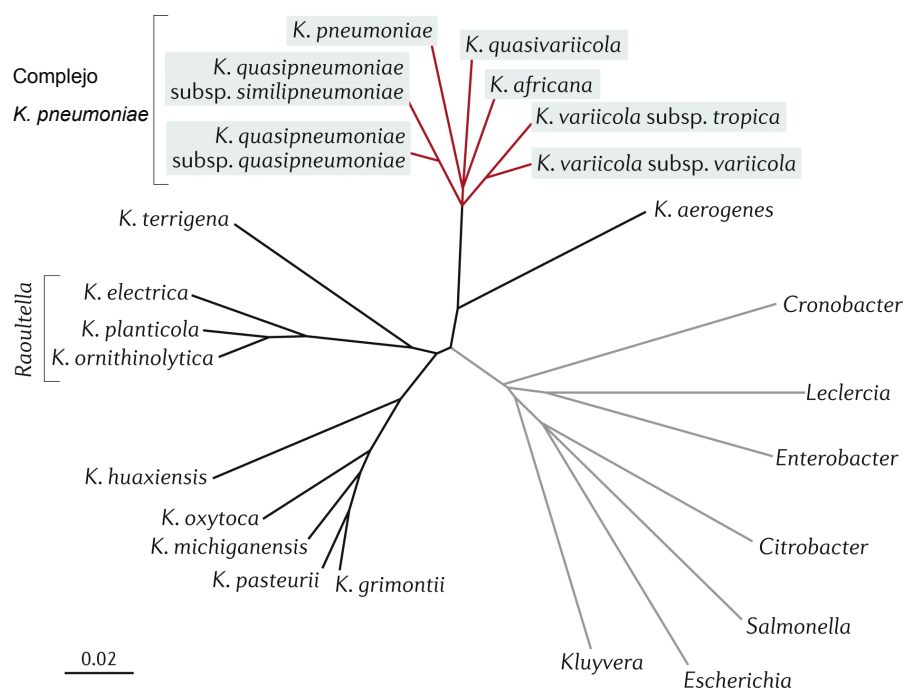


Figura 1. Árbol filogenético basado en el genoma completo que muestra la relación entre *K. pneumoniae*, las especies del complejo *K. pneumoniae* (ramas rojas), otros miembros del género *Klebsiella* (ramas negras) y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (ramas grises). *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella ornithinolytica* se les ha asignado el nombre de género *Raoultella* basándose en las secuencias de *gyrB* (1), pero esto se debate porque convierte a *Klebsiella* en no monofilética. Figura adaptada de Wyres K1 y colaboradores, *Nat Rev Microbiol* **18**, 344-359 (2020).

La especificidad de nicho de estas especies aún no se conoce bien, aunque hay pruebas claras de que *K. variicola* está asociada a las plantas y suele ser portadora de un operón de fijación de nitrógeno (*nif*) y de celulasas que no tienen las demás especies (15,16). Todas las especies del complejo *K. pneumoniae* se han aislado en el intestino humano, y todas, menos *K. variicola* subsp. *tropica*, se han aislado de infecciones en humanos (19). *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* son agentes relativamente comunes en infecciones nosocomiales (16,21) que pueden adquirir genes de resistencia a los antimicrobianos y plásmidos de *K. pneumoniae* (22,23). Ambas especies han sido notificadas como agentes causante de brotes nosocomiales (22,24), causa de abscesos hepáticos adquiridos en la comunidad (24,25) y también han sido aislados de animales (26). A pesar de esto, dentro del complejo *K. pneumoniae*, la especie clínicamente más importante es *K. pneumoniae*, causando entre un 87% y un 96% de las infecciones clínicas (16,27).

1.1. El patógeno *Klebsiella pneumoniae*.

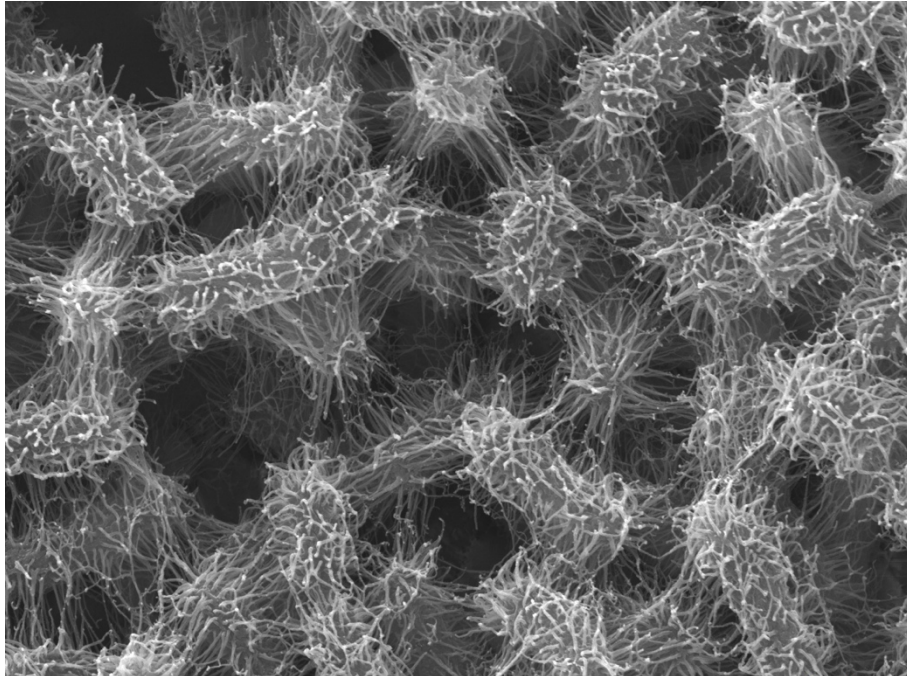


Figura 2. Imagen de microscopía electrónica de barrido de *K. pneumoniae* Kp3380. Imagen tomada a una magnitud 15000x.

Friedlander, en 1882, aisló un bacilo encapsulado de pulmones de pacientes que morían por neumonía. Originalmente se le denominó bacilo de Friedlander y no fue hasta 1886 cuando la bacteria obtuvo el nombre de *Klebsiella* (28). *K. pneumoniae* es un bacilo gram-negativo, no móvil, con forma de varilla, encapsulado, fermentador de lactosa y de naturaleza ubicua. Reside en superficies mucosas de mamíferos y en el ambiente, incluyendo suelos, superficies acuosas e instrumental médico (10,29). Habitualmente es un patógeno oportunista y representa una de las causas principales tanto de las infecciones producidas en el ambiente hospitalario como de las adquiridas en la comunidad. Ha sido incluida por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (*Infectious Diseases Society of America, IDSA*) en el grupo de los patógenos más preocupantes implicados en la resistencia a los antibióticos. Además, *K. pneumoniae* junto con otros patógenos multiresistentes (*multidrug-resistant*,

MDR) y/o extremadamente resistentes (*extensive drug-resistant, XDR*) a los antibióticos, ha sido incluido dentro de los microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter species*). El término MDR determina los aislamientos resistentes a al menos un antimicrobiano en tres o más familias de antibióticos, mientras que XDR se aplica a aislamientos resistente a al menos un agente de todas las categorías de antimicrobianos, salvo dos o menos. En ambos casos, en el caso de *K. pneumoniae* no se tiene en cuenta la ampicilina ya que es intrínsecamente resistente a este antibiótico (30).

Este termino, se utilizó para designar a las bacterias causantes de la mayoría de las infecciones nosocomiales, las cuáles poseen la capacidad de “escapar” a los efectos de los antibióticos (31–33).

El éxito de *K. pneumoniae* como patógeno parece estar más relacionado con la habilidad de este patógeno de establecer una buena defensa frente al hospedador en lugar de un buen ataque (34). Esto se ejemplifica con la capacidad de estas bacterias para evadir muchos componentes del sistema inmunitario y colonizar distintos tejidos del hospedador. *K. pneumoniae* coloniza fácilmente las superficies mucosas humanas, incluyendo el tracto gastrointestinal y la orofaringe, facilitando la posibilidad de establecerse en otros tejidos y causar infecciones graves. En personas sanas, las tasas de colonización de *K. pneumoniae* oscilan entre el 5 y el 35% en el tracto intestinal y entre el 1 y el 5% en la orofaringe; la piel suele estar colonizada sólo de forma transitoria, siendo el contagio de persona a persona el modo de adquisición predominante (10,29,35). Este patógeno causa una gran variedad de infecciones nosocomiales y en la comunidad. Existen dos poblaciones de *K. pneumoniae* con fenotipos muy diferenciados. Uno de los grupos se caracteriza por tener un amplio

perfil de resistencia a los antibióticos y están implicadas en infecciones hospitalarias afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos. La otra población la constituyen las cepas con un fenotipo altamente virulento y suelen estar implicadas en infecciones en la comunidad en pacientes sanos inmunocompetentes.

Para el manejo de las infecciones causadas por este patógeno es necesario tener en cuenta estos diferentes tipos de *K. pneumoniae* que causan enfermedades importantes y los tipos de enfermedades que causan (34).

1.1.1. Cepas clásicas de *K. pneumoniae*.

Las cepas clásicas de *K. pneumoniae* (**classic *K. pneumoniae*, cKp**), producen la mayoría de las infecciones por *K. pneumoniae* en hospitales y centros socio-sanitarios, como por ejemplo, las residencias de ancianos de los países occidentales desarrollados. Las infecciones más comunes producidas por cKp son la neumonía, las infecciones del tracto urinario, infecciones abdominales, infecciones asociadas a dispositivos intravasculares, infecciones de herida quirúrgica, infecciones de tejidos blandos y la posible complicación de todas ellas a una posterior bacteriemia (9). La adquisición de diferentes genes de resistencia a múltiples antibióticos es una de las características principales que muestran este tipo de cepas bacterianas. Su alto nivel de resistencia a los antibióticos usados en el ambiente hospitalario le confiere una ventaja adaptativa que tiene como resultado su diseminación y su alta prevalencia como agente causante de infecciones nosocomiales. Entre los determinantes de resistencia adquiridos por *K. pneumoniae* ampliamente distribuidos en esta especie se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas. La transferencia horizontal de plásmidos que expresan estos determinantes de resistencia es un mecanismo esencial para la dispersión de la resistencia a antimicrobianos y la persistencia de estas cepas en el ambiente hospitalario (36).

Estas cepas MDR se han relacionado con brotes en diferentes áreas hospitalarias, en particular en unidades de cuidados intensivos y en áreas de atención a neonatos (37). Los pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia tienen un mayor riesgo de sufrir infecciones causadas por cKp. Pacientes con cáncer, diabetes, enfermedad hepática crónica, trasplantes de órgano sólido o pacientes en diálisis son más propensos a ser infectados por este tipo de *K. pneumoniae* (34).

1.1.2. Cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*.

A partir de 1980 se identificaron los primeros aislamientos de otro tipo de cepas de *K. pneumoniae* capaces de producir infecciones en individuos jóvenes y sanos siendo Shon y colaboradores (38) los primeros en describirlas. Los primeros casos se localizaban en la cuenca del Pacífico Asiático (39–42), sin embargo, desde el año 2000, se han propagado por diversos países del mundo (43–45), incluido en España (46,47). Estas cepas se conocen como *K. pneumoniae* hipervirulentas (**hypervirulent *K. pneumoniae*; hvKp**) ya que, a pesar de no mostrar una amplia resistencia a los antimicrobianos, expresan una serie de factores de virulencia que le confieren la capacidad de infectar tanto a pacientes sanos como inmunodeprimidos.

Las variantes hvKp son cepas invasivas, con hipermucoviscosidad e hipervirulencia, que causan infecciones extrahospitalarias como el absceso hepático piógeno, neumonía, meningitis y endoftalmitis (38,48). Utiliza diferentes factores de virulencia para incrementar su patogénesis y asegurar su supervivencia, tales como la cápsula, sideróforos, lipopolisacáridos, fimbrias, proteínas de la membrana externa y sistema de secreción tipo 6, de los cuales los dos primeros son dominantes (49).

Son propensas a causar metástasis en otros órganos y/o tejidos, como por ejemplo, los pulmones, la pleura, la próstata, los huesos, las articulaciones, los riñones, el bazo, el músculo/fascia, los tejidos blandos, la piel, los ojos y el sistema nervioso

central entre el 11-80% de los casos (39,40,50–56). La diabetes mellitus es la comorbilidad más común en los pacientes infectados y es un factor de riesgo conocido para en individuos sanos. Además, aunque la diseminación metastásica es común en determinados patógenos gram-positivos, como por ejemplo *S. aureus*, es poco común en patógenos como *E. coli*, *Proteus* o cKp. Aunque la mortalidad derivada de infecciones causadas por cepas hvKp ha disminuido hasta el 5% (48), el pronóstico a largo plazo sigue siendo malo en los pacientes con complicaciones oculares o neurológicas a pesar del amplio perfil de sensibilidad de estos patógenos (37). Afortunadamente, los aislamientos de hvKp suelen ser sensibles a la mayoría de los antibióticos, sin embargo ya existen casos descritos de cepas hvKp portadoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o carbapenemasas. Las infecciones causadas por este tipo de cepas MDR con un elevado potencial patogénico pueden ser graves o incluso mortales debido a la falta de opciones terapéuticas (57–59).

La capacidad y/o facilidad que muestra *K. pneumoniae* para adquirir mecanismos de resistencia y virulencia es uno de los principales motivos de su éxito como patógeno. La combinación de ambos mecanismos favorece que este patógeno cause infecciones recurrentes y con opciones terapéuticas cada vez más limitadas (60–63). La aparición y propagación de nuevos clones MDR dentro de cKp y la difusión internacional de las cepas hvKp han puesto de manifiesto la relevancia de *K. pneumoniae* como patógeno.

1.2. Estructura poblacional de *K. pneumoniae*.

Los estudios genómicos muestran que la población de *K. pneumoniae* es diversa pero altamente estructurada. Esta estructura natural facilita el estudio

epidemiológico y evolutivo de las variaciones genéticas implicadas en aspectos clínicamente relevantes. Comprender esta estructura es clave para llevar a cabo el diseño de estudios destinados a dilucidar los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y a la patogenicidad y/o virulencia en *K. pneumoniae*, así como su interpretación y el posterior diseño de estrategias de control eficaces (64).

Los genomas típicos de *K. pneumoniae* tienen un tamaño aproximado entre 5 y 6 Mb y codifican entre 5.000 y 6.000 genes. Aproximadamente 1.700 genes están conservados en la inmensa mayoría de los miembros de la especie ($\geq 95\%$), éstos son los denominados genes principales (*core-genes*), mientras que el resto están presentes de forma variable, denominándose genes accesorios (*accessory-genes*) (16,65). Estos genes accesorios están presentes sólo en algunos miembros de la especie. El conjunto total de los genes principales y los accesorios es el pan genoma (66), el cuál es extremadamente diverso, probablemente, superando las 100.000 secuencias que codifican proteínas. La mayoría de los genes accesorios son raros en la población, es decir, están presentes en menos de un 10% de los genomas. Los análisis taxonómicos y de contenido de guanina-citosina sugieren que estos genes se comparten en una amplia gama de especies bacterianas, más comúnmente en otras especies de *Klebsiella* seguidas por otras enterobacterias, pero también en otros órdenes más distantes (16).

Para poder describir las distintas subpoblaciones de cepas, las cuales se denominan de forma genérica como clones, se utilizan distintos métodos basados en identificar un antecesor reciente común mediante el análisis de la variación alélica de los genes principales. Esto se puede llevar a cabo mediante análisis filogenéticos utilizando entre 1.000 y 2.000 genes pertenecientes al genoma principal, dando lugar a la identificación de los denominados linajes. Estos análisis muestran que la población de *K. pneumoniae* comprende cientos de linajes profundamente ramificados que

difieren entre sí en un ~0,5% de divergencia nucleotídica (16,67). Por otro lado, estos linajes se corresponden con los denominados grupos clonales (*clonal groups*; **CG**), los cuáles se identifican mediante tipificación multilocus de secuencias del genoma principal (*core genome Multi-locus Sequence Typing*; **cgMLST**) definiéndolos como subconjuntos de aislamientos que comparten cada uno un número mínimo de alelos de los incluidos en el cgMLST con al menos otro miembro del grupo (67). Por último, también se puede realizar la identificación de los clones mediante tipificación multilocus de secuencias (*Multi-locus sequence typing*; **MLST**), para la cuál se utilizan 7 genes dominantes principales de los cuáles se obtiene un perfil alélico que da lugar a las denominadas secuencias tipo (*sequence type*, **ST**) (68). Hay que tener en cuenta que el MLST se puede utilizar por sí sólo para definir los CG, pero a veces no distingue correctamente los grupos cuya ascendencia reciente se ve afectada por la recombinación cromosómica (64,69,70)

Los clones de *K. pneumoniae* se pueden distinguir unos de otros en función del contenido de genes accesorios (16). Esto puede explicarse por la adaptación de clones específicos a nichos específicos a través de la transferencia horizontal de genes, siempre y cuando se produzca la migración entre nichos (71). Sin embargo, también hay muchas pruebas de transferencia horizontal de genes entre distintos clones o especies, como lo demuestra la presencia de islas genómicas y elementos genéticos móviles en muchos aislamientos bacterianos. Los genes codificados en las islas genómicas pueden ayudar a estos aislamientos a adaptarse a sitios específicos de infección o colonización (72–74). Esta transferencia horizontal puede ser en gran parte impulsada por la recombinación cromosómica y por la conjugación mediada por plásmidos (75,76). Sin embargo, la transducción mediada por fagos y los elementos conjugativos integradores (*integrative conjugative elements*; **ICEs**) (77,78) también

desempeñan un papel importante. Los ICEs son partes móviles del ADN que codifican la maquinaria necesaria para su propia integración y escisión del cromosoma del hospedador bacteriano y su transferencia entre células bacterianas (64,77). La recombinación homóloga entre cromosomas está dominada por el intercambio de loci de biosíntesis de la cápsula (75), que es un determinante clave en la patogenicidad, y puede dar lugar a la adquisición de regiones de ADN que superan 1 Mb de longitud (77,79). Parece que algunas cepas de *K. pneumoniae* pueden ser especialmente permisivas para la captación y/o el mantenimiento de plásmidos, lo que da lugar a cargas de plásmidos que suelen ser mayores que las notificadas para *Escherichia coli* y otros patógenos gram-negativos del grupo ESKAPE (80). Por ejemplo, no es infrecuente que una cepa de *K. pneumoniae* sea portadora de entre cuatro y seis plásmidos diferentes, llegando a adquirir hasta 10 en algún caso (80,81). La mayoría de los genomas completos de *K. pneumoniae* llevan múltiples profagos (77), y se han aislado y secuenciado múltiples fagos distintos de *K. pneumoniae*, incluso para su uso potencial como agentes terapéuticos (82). Sin embargo, aún no se han realizado estudios sistemáticos sobre la diversidad de profagos dentro de la población. Los sistemas CRISPR-Cas9, y los sistemas de modificación de la restricción, están presentes de forma variable en la población de *K. pneumoniae*, pero aún no está claro cómo se relacionan con la diversidad de plásmidos y fagos (64,75,83). Los elementos del genoma accesorio pueden identificarse o predecirse utilizando diversas aplicaciones *in silico*, entre ellas el cálculo del contenido de guanina-citosina y el análisis genómico comparativo (84,85).

En general, los genes que forman parte del genoma accesorio pueden codificar factores de virulencia, mecanismos de resistencia a los antibióticos o estar implicados en procesos específicos, como, por ejemplo, la fijación del nitrógeno (78,86–88)

Además, el actual pan genoma de *K. pneumoniae* consta de casi 30.000 secuencias únicas codificantes de proteínas y todavía está abierto, lo que indica que hay más genes accesorios aún por identificar y caracterizar (16).

1.3. Clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*.

Las infecciones por *K. pneumoniae* son causadas por diversos clones que están ampliamente distribuidos geográficamente. El término "clon" en este contexto se refiere a cualquier bacteria aislada en un momento y lugar específicos que muestran orígenes filogenéticos comunes (89). Dichos aislamientos o cepas tienen rasgos fenotípicos y genotípicos similares, lo que indica que pertenecen al mismo linaje procedente de un ancestro común. Este término es útil en el campo de la epidemiología molecular, particularmente cuando se estudian las posibles relaciones entre cepas obtenidas de diferentes áreas geográficas durante varios períodos de tiempo.

Es relativamente frecuente encontrar cepas de *K. pneumoniae* con un fenotipo MDR como agente causal de diferentes enfermedades infecciosas, sin embargo, sólo ciertos clones que poseen las características genotípicas y fenotípicas necesarias pueden ser definidos como “clones de alto riesgo” (*high-risk clones*, **HRC**).

Los HRC probablemente posean mecanismos biológicos beneficiosos que contribuyen de forma positiva a su eficacia biológica. Esta ventaja adaptativa les da la capacidad de competir con otras bacterias y desplazarlas para convertirse en la parte principal de la población bacteriana.

Los HRC comparten características tales como:

- Haber sido obtenidos de diferentes ubicaciones geográficas en todo el mundo.
- Poseer varios determinantes de resistencia a múltiples antibióticos.

- Ser capaces de colonizar y persistir en los hospedadores durante intervalos de tiempo prolongados.
- Transferirse eficazmente entre diferentes hospedadores.
- Mostrar un mayor potencial patogénico y/o eficacia biológica.
- Tener la capacidad de causar infecciones graves y/o recurrentes (90).

La alta diseminación de ciertos HRc de *K. pneumoniae* , así como el movimiento de ciertos genes de resistencia entre diversos clones ,han desempeñado un papel muy relevante en la propagación de genes de resistencia a nivel global agravando la crisis de la resistencia antibióticos (64). Al igual que con las dos poblaciones principales de *K. pneumoniae* (cKp y hvKp), también hay dos tipos de HRc dentro de esta especie: los clones MDR y los clones hipervirulentos.

Los clones hipervirulentos son menos diversos que sus equivalentes MDR, y muestran una menor diversidad genética, lo que sugiere que pueden estar sujetos a algún tipo de limitación para la adquisición de genes. Por lo tanto, la probabilidad de adquisición de plásmidos de virulencia por clones MDR es mayor que la probabilidad de adquisición de plásmidos MDR por clones hipervirulentos. Esto es especialmente preocupante desde la perspectiva del control de infecciones hospitalarias, ya que muchos de los clones MDR están bien adaptados a la transmisión y colonización en humanos y muestran un gran potencial para causar brotes hospitalarios (75). La relevancia clínica de estos clones crea la necesidad de identificarlos, vigilarlos y controlarlos de una manera más exhaustiva.

1.3.1. Clones multirresistentes.

La mayoría de brotes hospitalarios causados por *K. pneumoniae* MDR son debidos a un grupo limitado de clones. Estos clones MDR pueden trasportar múltiples plásmidos portadores de diversos genes que le confieren resistencia múltiples

antibióticos. Un conjunto de los clones más resistentes, incluyendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación y antibióticos carbapenémicos, se han convertido en un problema a nivel mundial. Entre ellos, se encuentra el ampliamente estudiado ST258, englobado junto con su derivado ST512 y el ST11 dentro del CG258. Otros clones MDR relevantes son el ST15 y el ST14, pertenecientes al CG15, el ST17 y ST20 incluidos dentro del CG20, el ST29, el ST37, el ST147, el ST101 y el ST307. Estos HRC no están genéticamente relacionados entre sí, pero sí están ampliamente distribuidos geográficamente y poseen un alto potencial para causar infecciones nosocomiales y/o brotes hospitalarios (16,91,92).

Aunque todos estos clones MDR se agrupan dentro de los clones de *K. pneumoniae* diseminados mundialmente existen diferencias importantes en cuanto a la distribución geográfica de cada uno de ellos (27,93–103), siendo los ST pertenecientes a los CG258, CG15 y CG307 los más prevalentes a nivel mundial (Figura 3).

El ST258 y su derivado ST512 son los clones de *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos carbapenémicos (*carbapenem resistant K. pneumoniae*; **CRKp**) dominantes en América y en el sur de Europa, siendo raros en otras regiones del mundo. El clon ST11, del cual derivó el ST258 por recombinación (76,104) representa aproximadamente el 12% de CRKp en toda Europa, estando mucho más ampliamente distribuido que el ST258 o el ST512. Además, el ST11 es también el clon dominante que causa infecciones por CRKp en China. Por otro lado, el ST307 ha comenzado a desplazar al ST258 y al ST512 en América y en el sur de Europa y se ha posicionado como el clon de CRKp dominante en Sudáfrica (105). En España, en los últimos años se ha visto un aumento de los aislamientos pertenecientes al clon ST307 resistente a los carbapenémicos asociados con brotes nosocomiales e infecciones sanguíneas (106). Sin embargo, fuera de estas regiones, normalmente es sensible a los antibióticos

carbapenémicos y resistente a las cefalosporinas de tercera generación. El ST15 y el ST14 se encuentra entre los clones más comunes resistentes a las cefalosporinas de tercera generación en diversas áreas geográficas y está asociado a numerosos casos de variantes resistentes a los antibióticos carbapenémicos ampliamente diseminadas (Figura 3)(27,107,108).

Es importante destacar que, aunque muchos estudios atribuyen a un pequeño número de clones la mayoría de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación y/o a antibióticos (27) , en muchas regiones sigue habiendo una parte importante de infecciones causadas por clones MDR esporádicos o a clones que causan problemas a nivel local (64,109).

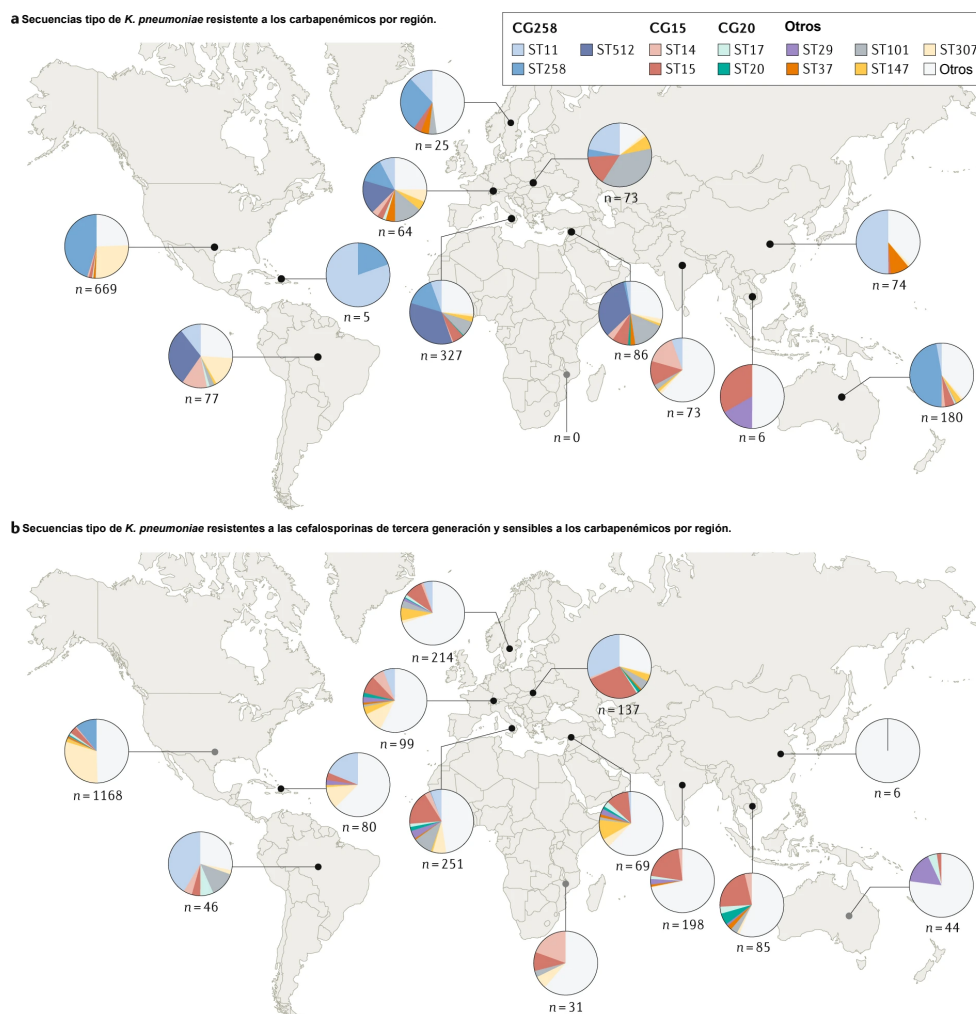


Figura 3. Distribución y frecuencia de las secuencias tipo de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos a nivel mundial **(a)**. Distribución y frecuencia de las secuencias tipo de *K. pneumoniae* resistente a las cefalosporinas de tercera generación y sensibles a los antibióticos carbapenémicos a nivel mundial **(b)**. Figura adaptada de Wyres KL y colaboradores, *Nat Rev Microbiol* **18**, 344-359 (2020).

1.3.2. Clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST15.

K. pneumoniae ST15, junto con el ST14, pertenece al CG15 que se encuentra entre los clones MDR más prevalentes a nivel global. Este grupo clonal es el responsable del 20% de todos los brotes hospitalarios descritos en el mundo. En particular, el HRc ST15 de *K. pneumoniae* se considera un clon con una alta capacidad para ocasionar brotes hospitalarios de *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos carbapenémicos (110).

Las cepas de *K. pneumoniae* ST15 muestran un patrón de resistencia variable en función de la zona geográfica. Este hecho está probablemente relacionado con la alta diversidad de plásmidos de resistencia que se han detectado en este HRc, proporcionándole un perfil de resistencia específico. Esta diversidad en cuanto los plásmidos de resistencia adquiridos por el clon ST15 en los distintos lugares del mundo ponen de manifiesto su alto potencial para adquirir nuevos genes de resistencia mediante transferencia horizontal. Así, este clon de alto riesgo se considera un candidato óptimo para la convergencia de los fenotipos de resistencia e hipervirulencia, a través de la adquisición de plásmidos híbridos, que llevan determinantes tanto de resistencia como de virulencia (111).

Este HRc ha sido identificado como un importante portador de BLEEs, principalmente CTX-M-15 (112), aunque también expresa los cuatro grandes grupos

de carbapenemasas: KPC, NDM, VIM y OXA48. Se ha detectado ST15 portador de NDM-1 en Nepal y Pakistan (107,108); OXA-48 en España (113) y Vietnam (114) , OXA-232 en China (115); KPC-3 en Portugal(116); y KPC-2 en Bulgaria y China (117,118).

K. pneumoniae ST15 se asocia tanto con infecciones humanas como animales. Se ha detectado el clon ST15 en varios animales de compañía en la comunidad. Por ejemplo, se ha detectado *K.pneumoniae* ST15 productora de OXA-48 en perros de una clínica veterinaria en Alemania (119), así como en diferentes animales en Japón, Francia y Alemania. En otros países europeos también se han identificado animales infectados y colonizados con clones portadores de CTX-M-15 (120–122).

Además, el ST15 se encuentra entre los clones de *K. pneumoniae* más frecuentemente aislados como colonizadores del tracto gastrointestinal (123,124), lo cual favorece su diseminación. Además este clon contribuye positivamente a la propagación de plásmidos de resistencia al producirse la transferencia de los mismos entre distintas enterobacterias de la microbiota intestinal (125,126). Asimismo, la incidencia de infecciones también aumenta en pacientes colonizados con el peligro que ello acarrea por la dificultad de tratamiento que supone la infección con bacterias MDR (127).

1.3.3. Clones hipervirulentos.

La mayoría de las infecciones invasivas adquiridas en la comunidad son causadas por clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* que expresan un número importante de genes de virulencia y rara vez poseen plásmidos portadores de genes de resistencia.

A diferencia de las infecciones causadas por clones MDR, las infecciones producidas por clones hipervirulentos están dominadas por los mismos clones en todas

las regiones. Los más comunes son el ST23 y el ST57, ambos pertenecientes al CG23, seguido de los clones incluidos en el CG65 (ST65 y el ST375) y el CG86. Sin embargo los clones englobados dentro del CG25, el CG66 y el CG380 se encuentran en menor frecuencia (128–131). En consonancia con la alta prevalencia de las cepas hvKp en la cuenca del Pacífico Asiático, el ST23 y el ST57 se identificaron recientemente entre los dos clones más comunes asociados a las infecciones del torrente sanguíneo por *K. pneumoniae* en China, Vietnam y Laos, representando más del 10% de los aislamientos (98,132). Los datos disponibles sobre la prevalencia de ST23 fuera de la cuenca del Pacífico Asiático son limitados porque la mayoría de los estudios se centran únicamente en los clones MDR, y los aislamientos del ST23 suelen ser sensibles a los fármacos (75,77). En la literatura disponible se sugiere que el clon ST23 representa menos del 2% de los aislamientos clínicos en otras regiones del mundo (65,98,99,133).

Es interesante destacar que aunque este clon se detectó hace ya 100 años (77), se encuentra mucho menos diseminado que otros clones MDR como el ST258 y el ST307, que han aparecido ambos a mediados de la década de 1990 (64,79,92).

1.3.4. Diseminación de los clones de alto riesgo resistentes a los antibióticos carbapenémicos.

La propagación de los HRC es un proceso complejo que se puede producir a nivel local, nacional e internacional. La literatura destaca numerosas rutas de transmisión que incluyen la propagación de paciente a paciente en el hospital, la colonización silenciosa de personas en centros sociosanitario, la adquisición por contacto con una persona previamente colonizada, la transmisión a través de viajes de carácter médico, y posiblemente, también a través de la cadena alimentaria, los animales de compañía y las fuentes ambientales (91).

1.3.4.1. Propagación asociada al entorno hospitalario.

Una de las principales vías de transmisión de los HRc es la asociada a la medicina. Siendo *K. pneumoniae* considerado un patógeno nosocomial típico e incluso dominante (134), los hospitales son lugares clave para su diseminación.

K. pneumoniae se propaga de persona a persona, variando la capacidad de propagación entre los distintos portadores, siendo probablemente los que tienen una mayor concentración de *K. pneumoniae* en el recto los principales responsables de la contaminación ambiental (135). Por otro lado, su capacidad para sobrevivir en los equipos hospitalarios facilita también su diseminación (91,136). Además, los centros socio-sanitarios favorecen la diseminación entre el entorno hospitalario y el comunitario (137). Los centros socio-sanitarios son un importante reservorio para estos clones de alto riesgo (138), pudiendo actuar como fuente de reintroducción de HRc en los hospitales (91,139). En cuanto a la propagación comunitaria es todavía escasa, pero ya hay casos de colonizaciones tras el alta de un familiar (140) o casos de infecciones del tracto urinario sin exposiciones sanitarias recientes o antecedentes de viajes (141,142). Estos casos ponen de manifiesto la posible aparición de infecciones en la comunidad (91).

1.3.4.2. Reservorio animal.

Un posible reservorio de los clones de alto riesgo circulantes son los animales, pudiendo producirse un intercambio de patógenos con los humanos a través de la cadena alimentaria o el contacto cercano. Ya se han detectado distintos HRc en animales en distintos países (120–122,143), aunque por el momento, el papel de los animales como reservorio de HRc y su impacto en la salud humana aún no está claro y debe ser explorado más a fondo (91).

1.3.4.3. Propagación internacional.

La diseminación mundial de los HRc puede producirse debido a los viajes y el turismo internacionales (144). Esto puede incluir los viajes de carácter médico (145), viajes en los cuales se hace un uso fortuito de instalaciones sanitarias o viajes a un país donde un determinado clon sea endémico (146,147). En los viajes realizados por razones médicas se pueden producir dos tipos de vías de propagación. Por un lado, el paciente puede proceder de un región epidémica y transmitirlo en el nuevo destino (148) o por el contrario, el paciente se coloniza y/o infecta durante su hospitalización en un país donde el HRc es endémico (149). Esta propagación internacional de HRc también se puede producir a través de las relaciones comerciales internacionales, pudiendo diseminarse a través de la cadena alimentaria (91,150,151).

Así pues, la rápida diseminación de clones de *K. pneumoniae* y de los genes de resistencia que portan, es una grave amenaza que requiere acciones inmediatas. La vigilancia activa en los centros sanitarios junto con medidas para detener la contaminación ambiental son la clave para reducir esta diseminación. Además, se necesita profundizar en el estudio de la patogénesis de estos clones, así como de los mecanismos responsables de su alta capacidad de transmisión, para elucidar las claves de su éxito como patógenos. La identificación de los determinantes genéticos específicos de estos HRc podría favorecer no sólo la detección de este tipo de clones si no también proporcionar nuevas dianas para controlar su diseminación y mejorar el diagnóstico (91).

1.4. Riesgo de transmisión y brotes en entornos sanitarios.

K. pneumoniae resistente a los antibióticos carbapenémicos (CRKp) tiene un alto potencial para causar brotes en entornos sanitarios. Se han notificado brotes causados por CRKp en varios Estados miembros de la Unión Europea (UE), como la República Checa, Francia, Alemania, Grecia, España, Italia y Reino Unido (152–157). Algunos de estos países poseen, en términos generales, bajos porcentajes de resistencia a los antibióticos carbapenémicos en *K. pneumoniae*, lo que indica que los brotes pueden ocurrir independientemente de su prevalencia en un país determinado. Por lo tanto, todos los países de la UE están en riesgo de que se produzcan brotes por este patógeno. Los factores de riesgo para la adquisición de CRKp en entornos sanitarios son similares a los descritos para la adquisición de otras bacterias MDR. Entre ellos se encuentran el ingreso en una unidad de cuidados intensivos, la estancia prolongada en estas unidades, la enfermedad crítica, los dispositivos invasivos y el tratamiento antimicrobiano previo (158,159). Un meta-análisis descubrió que el uso de dispositivos médicos y el tratamiento con antibióticos carbapenémicos eran los factores de riesgo más significativos para la adquisición de CRKp por parte de los pacientes hospitalizados (160). También se ha demostrado que los centros socio-sanitarios son un reservorio de CRKp en algunos entornos, incluso en países de la UE (5,161–164).

Se ha documentado el papel del entorno hospitalario, incluidas las tuberías de aguas residuales, los lavabos y los fregaderos mal diseñados, como reservorio y fuente de CRKp, y se ha descubierto que es el origen de algunos brotes que requieren un tratamiento especial del agua o medidas de desinfección para su control de forma eficaz (165,166). Estudios recientes sobre brotes que utilizan métodos epidemiológicos basados en la genómica, incluida la secuenciación completa del genoma, han revelado la existencia de reservorios ambientales hospitalarios de una

gran variedad de bacterias, con plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos carbapenémicos y que se transfieren entre diversas especies y diferentes tipos clonales de enterobacterias (165–168). Los HRC, como por ejemplo el clon ST258 productor de KPC de *K. pneumoniae*, son muy eficientes en la colonización de hospedadores humanos, adaptándose a los entornos hospitalarios. Son responsables de brotes en hospitales de toda Europa. Esto pone de relieve el valor de la vigilancia genómica para detectar y rastrear los brotes causados por bacterias resistentes, así como la necesidad de desarrollar estrategias adecuadas para su control (5).

2. Mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*.

El descubrimiento de la penicilina por Sir Alexandre Fleming en 1928, siendo su primera preinscripción en 1940, dio lugar al inicio de la era moderna de los antibióticos (169,170). Durante la Segunda Guerra Mundial fue el antibiótico de elección para controlar las infecciones bacterianas entre los soldados, pero desafortunadamente los primeros casos de resistencia a la penicilina no tardaron en llegar, amenazando los avances logrados en el control de las enfermedades infecciosas hasta la fecha (169,171). En 1950 nuevos antibióticos β -lactámicos fueron descubiertos, pero la aparición de los primeros casos de resistencia no se hizo esperar, aislándose *S. aureus* resistente a meticilina en 1962 en el Reino Unido y en 1968 en Estados Unidos (172). Hasta principios de 1980, la industria farmacéutica desarrolló e introdujo nuevos antibióticos, resolviendo el problema causado por las resistencias, pero con el paso del tiempo el ritmo de desarrollo de antibióticos se fue reduciendo (169,171). En 2019 la OMS identificó 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico frente a la lista de patógenos prioritarios publicada por la propia organización en febrero de 2017 (3), de los que solo seis se clasificaron como innovadores (4).

Las bacterias patógenas adquieren resistencia a los antibióticos, principalmente, mediante dos mecanismos genéticos diferentes. Por un lado, la producción de mutaciones espontáneas durante la replicación cromosómica. Estas mutaciones puntuales en el genoma bacteriano pueden provocar la modificación de proteínas diana de antibióticos específicos impidiendo su acción. Por otro lado, los elementos genéticos móviles, como por ejemplo los plásmidos o los bacteriófagos, transfieren genes de resistencia a los antibióticos entre poblaciones bacterianas a través de transferencia horizontal de genes. Esto permite a las bacterias patógenas desarrollar resistencia a los antibióticos por adquisición de genes ya existentes en otras bacterias (173).

K. pneumoniae es una de las bacterias que han experimentado un espectacular aumento de la resistencia a los antibióticos en las últimas décadas. Podemos encontrar varios mecanismos de resistencia en este patógeno, siendo la resistencia a los β -lactámicos la que tiene mayor impacto en la eficacia del tratamiento. El genoma accesorio es fundamental en la resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae*, con plásmidos portadores de genes de resistencia que reducen, preocupantemente, las opciones terapéuticas eficaces contra este patógeno (88). En la figura 4. se resumen los principales antibióticos utilizados en *K. pneumoniae* y sus mecanismos de resistencia.

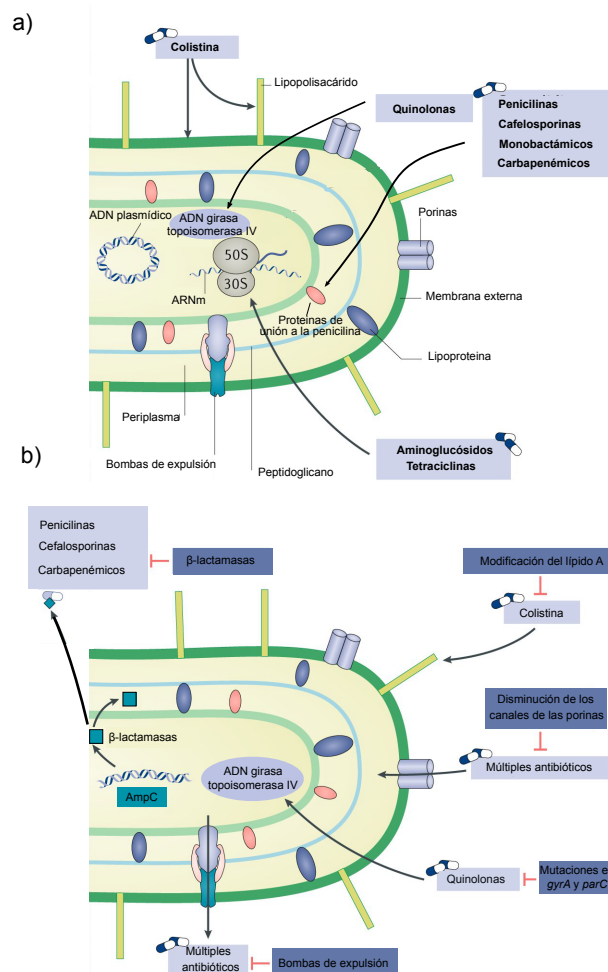


Figura 4. Principales antimicrobianos utilizados en *K. pneumoniae* **(a)** y sus mecanismos de acción **(b)**. Figura adaptada de Wang TZ y colaboradores, *Nat Rev Nephrol*, **15** 463-481 (2019).

2.1. Resistencia a los β-lactámicos.

Los antibióticos β-lactámicos son una gran clase de antibióticos, que incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Son los antibióticos más utilizados en la práctica clínica actualmente y se caracterizan por tener un anillo β-lactámico en su estructura molecular. El mecanismo principal de resistencia a los β-lactámicos en *K. pneumoniae* es la producción de β-lactamasas, que son enzimas capaces hidrolizar los antibióticos β-lactámicos, seguida de alteraciones en la

permeabilidad de membrana a través de la regulación de la expresión de bombas de expulsión y porinas (174).

2.1.1. β -lactamasas de espectro extendido

La resistencia a la penicilina en *K. pneumoniae* se detectó a principios de la década de 1960, lo que llevó a la identificación de los primeros genes que codificaban β -lactamasas, *bla*_{SHV-1} y *bla*_{TEM-1}. Dos décadas más tarde, se identificó en un aislamiento de *K. pneumoniae* el primer gen que codificaba una BLEE, *bla*_{SHV-2}, recuperado de un paciente ingresado en una UCI en Alemania (175). El gen presentaba una actividad de espectro extendido frente a los β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas de tercera generación y los antibióticos monobactámicos. *K. pneumoniae* se ha convertido en el principal patógeno portador de BLEEs asociado a brotes nosocomiales desde la identificación de estas enzimas durante la década de 1990-2000. Durante ese periodo, las cepas de *K. pneumoniae* albergaban, principalmente, β -lactamasas tipo TEM y SHV (176), con una alta presencia y difusión de sus variantes enzimáticas en numerosos países (177). Sin embargo, a principios de la década de 1990, surgió una nueva familia denominada CTX-M (178). Las CTX-M son ahora el tipo de BLEEs predominante, siendo la CTX-M-15 la más frecuente en *K. pneumoniae* (91,174,179,180).

Otro tipo de BLEEs, adquiridas mediante transferencia horizontal, son las BLEEs de tipo *bla*_{OXA} (181) y las mucho menos frecuentes *bla*_{GES}, *bla*_{SFO} (182), *bla*_{PER}, *bla*_{TLA}, *bla*_{VEB} (183) y *bla*_{KLUC-5} (184). La aparición de BLEEs con un espectro de actividad más amplio, como *bla*_{GES-4}, también dio lugar a la aparición de cepas resistentes a los carbapenémicos (110). Además, combinaciones de BLEEs con pérdida de porinas y la participación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC también

puede dar lugar a la pérdida de sensibilidad frente a los antibióticos carbapenémicos (185,186).

Normalmente, los diferentes tipos de BLEE se asocian a diferentes tipos plásmidicos entre los que se encuentran plásmidos epidémicos que contribuyen a la diseminación de las mismas (89).

2.1.2. Genes AmpC mediados por plásmidos.

La notable versatilidad de *K. pneumoniae* para incorporar plásmidos portadores de β -lactamasas, dio lugar a la aparición y dispersión de cefalosporinas plasmídicas de tipo AmpC (187,188). Estos genes surgieron entre finales de la década de 1980 y principios de la de 1990, en paralelo a la explosión de las BLEEs (187). Hidrolizan todas las penicilinas y las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y son resistentes al ácido clavulánico y al tazobactam (174). Las familias de enzimas tipo AmpC más abundantes en *K. pneumoniae* pertenecen a los tipos CMY, DHA, FOX y MOX. En cambio, las AmpC tipo ACT, MIR, ACC y LAT, muestran una baja prevalencia en *K. pneumoniae*. Aunque las β -lactamasas de tipo AmpC suelen ser plasmídicas, en 2009 se identificó en *K. pneumoniae* el primer gen cromosómico tipo *ampC* denominado *bla*_{CMY-2} (189). También se identificaron cepas de *K. pneumoniae* con una mayor resistencia a los β -lactámicos debido a la expresión de *bla*_{AmpC} o *bla*_{ACT-1} en combinación con la pérdida de porinas o con un aumento de expresión en las bombas de expulsión. La combinación de la hiperexpresión del gen *ampC* junto con la reducción de la permeabilidad de membrana, a través de la pérdida de porinas e hiperexpresión de bombas de expulsión, puede derivar en la pérdida de sensibilidad a antibióticos carbapenémicos (190).

Los genes de tipo AmpC también pueden alcanzar altos niveles de expresión debido a la existencia de múltiples copias de los plásmidos que los portan, o de la

potencia del promotor bajo el que se encuentra regulada la expresión de los mismos en el plásmido.

2.1.3. Carbapenemasas.

La aparición de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE ha provocado un aumento significativo del uso de los antibióticos carbapenémicos, que se han convertido en los antibióticos de último recurso para el tratamiento de las infecciones causadas por estos patógenos (191). La resistencia a los antibióticos carbapenémicos surgió por primera vez como resultado de alteraciones de la permeabilidad de membrana debido a la pérdida de porinas sin la presencia de genes codificantes de carbapenemasas (192). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos antibióticos ha favorecido la aparición de plásmidos portadores de enzimas capaces de hidrolizarlos, las carbapenemasas. Estas enzimas son enzimas capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos, incluidos los antibióticos carbapenémicos de última línea (193).

La primera carbapenemasa detectada en *K. pneumoniae* fue la metaloenzima IMP-1, detectada en Japón en 1991 (194). Varios años después, en 1996, apareció la primera KPC (*Klesiella pnemoniae* carbapenemasa), detectada en Estados Unidos (195). Aunque otras carbapenemasas han sido descritas por primera vez en *K. pneumoniae*, *bla*_{OXA-48} (196) y *bla*_{NDM-1} (197), las carbapenemasas de tipo KPC se convirtieron en las más prevalentes y de mayor impacto en *K. pneumoniae*. Se han descrito cepas productoras de KPC en todos los continentes, siendo sus variantes *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} las más frecuentes, con una alta prevalencia en cepas productoras de brotes nosocomiales (89). Los plásmidos portadores de genes que codifican carbapenemasas como *bla*_{OXA-48} y *bla*_{VIM} llegaron a *K. pneumoniae* y actualmente son considerados endémicos en diferentes países (198). Además, otros genes que codifican carbapenemasas como *bla*_{VIM-1} y *bla*_{NDM-1} se han movilizado desde los plásmidos al

cromosoma a través de elementos genéticos móviles específicos para estos genes de resistencia (91,110).

2.2. Resistencia a ceftazidima-avibactam

Los esfuerzos realizados en la última década para desarrollar nuevos inhibidores de β -lactamasas capaces de proteger a los β -lactámicos de la acción de las carbapenemasas han llevado a la introducción en el ámbito clínico de nuevos inhibidores de β -lactamasas.

En 2015 se aprobó el uso clínico del avibactam en combinación con la ceftazidima (199). La combinación ceftazidima/avibactam (CAZ/AVI) proporciona una valiosa estrategia para combatir las infecciones por CRKp. El avibactam protege a la ceftazidima de la hidrólisis causada por KPC, OXA-48, AmpC y BLEEs (200,201). Sin embargo, ya se ha empezado a observar un aumento de la resistencia a la combinación CAZ-AVI en el tratamiento de infecciones en pacientes con una larga exposición a esta combinación (202,203). La resistencia a CAZ/AVI se ha relacionado con mutaciones específicas en el gen *bla_{KPC}* (203–206) o en el gen *bla_{CTX-M-14}* (207) generalmente observadas dentro del bucle Ω (205,208,209). Además, también se ha demostrado que el aumento de la expresión de *bla_{KPC}* junto con alteraciones de las porinas Ompk35/36 (210) produce un aumento de la resistencia a CAZ/AVI. La nueva BLEE vietnamita, VEB-25, (211), la presencia de metallo- β -lactamasas y el aumento de la expresión de KPC también son mecanismos implicados en la resistencia a CAZ/AVI (212). La presencia de β -lactamasas, principalmente CTX-M-15, y/o la pérdida de porinas podrían estar implicado en un fenotipo de baja resistencia (213). Recientemente, también se ha observado que el gen *bla_{CMY-172}* fue responsable de un

alto nivel de resistencia a CAZ/AVI en cepas clínicas de *K. pneumoniae* productoras de KPC en China (214).

2.3. Resistencia a los aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son antibióticos capaces de inhibir la síntesis proteica bacteriana. Se utilizaron activamente desde mediados de la década de 1940 hasta 1980 que fueron sustituidos por las cefalosporinas de tercera generación, los antibióticos carbapenémicos y las fluoroquinolonas (215). Durante ese periodo de uso, *K. pneumoniae* adquirió los principales mecanismos de resistencia frente a este grupo, que implican enzimas que dan lugar a modificación de aminoglucósidos mediante diferentes actividades, como la acetilación, la adenilación, la fosforilación o la nucleotidilación (216). Los grupos de enzimas que llevan a cabo cada una de las actividades son AAC, AAD, APH y ANT, respectivamente. En 10 años, se identificaron en *K. pneumoniae* genes de resistencia mediados por plásmidos de todas los grupos.

La disminución del uso de aminoglucósidos frenó la evolución de nuevos mecanismos de resistencia hasta el descubrimiento de la ARN ribosomal (ARNr) 16S metilasa, perteneciente a la familia de genes *armA*, que codifica enzimas que impiden que los aminoglucósidos se unan a su diana, los ARNr 16S (217). Estos genes son codificados en plásmidos en *K. pneumoniae* (218). Mientras que las enzimas modificadoras de fármacos tienen un estrecho espectro de actividad, las ARNr 16S metilasas confieren resistencia a prácticamente todos los aminoglucósidos, incluida la plazomicina, el aminoglucósido más recientemente desarrollado (219). La localización cromosómica de *armA* se ha descrito una sola vez en *K. pneumoniae* (220). También

se encontraron las ARNr 16S metilasas plasmídicas de las familias Rmt y NpmA (215), aunque por el momento no existe evidencia de su localización cromosómica.

Los mecanismos de resistencia cromosómica frente a los aminoglucósidos en *K. pneumoniae* incluyen modificaciones en la permeabilidad de membrana externa debido a la regulación de las bombas de expulsión AcrAB-TolC y KpnEF y a la pérdida de la porina KpnO. Las mutaciones que confieren resistencia a través de la modificación de la diana, como *rrs* o *rpsL*, no se han encontrado todavía en cepas clínicas de *K. pneumoniae*. Es posible que las mutaciones en el gen *rpsL* estén relacionadas con un alto coste en la eficacia biológica y una menor virulencia, por lo que son menos frecuentes. Múltiples copias de *rrs* en el cromosoma también pueden favorecer el desarrollo de resistencia mediante mutaciones en este gen (91,221,222).

2.4. Resistencia a las quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos que actúan inhibiendo las enzimas ADN girasa y la topoisomerasa IV dando lugar a un bloqueo en la replicación del ADN. Estos fármacos se han utilizado en la práctica clínica desde la década de 1960, pero su uso aumentó ampliamente después de la introducción de las primeras fluoroquinolonas en la década de 1980, lo que ha favorecido la aparición de mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas (223). En *K. pneumoniae* se han descrito todos los mecanismos de resistencia conocidos frente a las quinolonas en patógenos gram-negativos (224), incluyendo mutaciones de su diana de acción, aumento de la producción de bombas de expulsión, enzimas modificadoras y/o proteínas de protección de la diana.

Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* tratadas con ácido nalidíxico, la primera quinolona aprobada clínicamente (225) y norfloxacin, la primera

fluoroquinolona utilizada en el tratamiento de *K. pneumoniae* (226), fueron acompañadas por las primeras evidencias de resistencias cromosómicas frente a ambos compuestos (227,228). El primer y principal mecanismo de resistencia son las mutaciones cromosómicas en las dianas de unión de las quinolonas, la ADN girasa (subunidades *gyrA*-*gyrB*) y la topoisomerasa IV (subunidades *parC*-*parE*). Las mutaciones en *gyrA* y *parC* en *K. pneumoniae* (229) se reconocieron antes que las mutaciones en *gyrB* (230) y *parE* (231), y son probablemente más comunes (230).

También se ha observado que los cambios en la permeabilidad de membrana de *K. pneumoniae* están implicados en la resistencia a las quinolonas, de forma similar a su papel en la resistencia a los β -lactámicos. Estos incluyen la pérdida de la porina OmpK36 (232), la sobreexpresión de la bomba de expulsión *acrAB* (233) y la producción inalterada de la bomba de expulsión *kdeA* (234). Otra bomba de expulsión importante en *K. pneumoniae*, OqxAB, supuestamente cromosómica, se ha visto implicada en la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (RQMP), facilitando su movilización y propagación entre bacterias (235). También se ha observado que los reguladores de las bombas de expulsión están implicados en la resistencia a las quinolonas en *K. pneumoniae*.

Otro grupo de genes de resistencia a las quinolonas son los determinantes RQMP que se encuentran en también en otras enterobacterias (236). Estos genes incluyen miembros de los genes *qnr*, que codifican una familia de proteínas que protegen la ADN girasa y la topoisomerasa IV de la actividad inhibidora de las quinolonas. El primer gen *qnr* descrito en *K. pneumoniae* fue descubierto en un plásmido aislado en 1994 en Estados Unidos (237). No se han encontrado genes *qnr* codificados en el cromosoma de *K. pneumoniae*, aunque si lo están en otras bacterias

gram-negativas como *Shewanella alga*, *Citrobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrionaceae* y *Serratia marcescens* (238,239).

Otro gen RQMP, *aac(6)-Ib-cr*, es el único responsable de la modificación de quinolonas en *K. pneumoniae*. Desactiva quinolonas de espectro estrecho como la ciprofloxacina y la norfloxacina, que llevan el grupo piperazinilo no sustituido, un sustrato de esta enzima (239). Inicialmente, estaba codificada en un plásmido en *K. pneumoniae*, pero recientemente se ha encontrado en el cromosoma de esta especie (239). La resistencia a los aminoglucósidos suele ir acompañada de resistencia a los β -lactámicos y a las fluoroquinolonas; *aac(6)-Ib-cr* confiere resistencia a los aminoglucósidos y a las fluoroquinolonas (240).

El gen RQMP *qepA* codifica una proteína de una bomba de expulsión (241), pero todavía no ha sido encontrado en el cromosoma de *K. pneumoniae*. La expresión de los genes RQMP confiere niveles bajos o moderados de resistencia a las quinolonas, pero crean condiciones favorables para la aparición de mutantes genéticos cromosómicos, y por consiguiente para generar resistencia de alto nivel (242).

Curiosamente, la presencia de otros genes de resistencia junto con los determinantes RQMP proporciona una selección cruzada a pesar del antibiótico elegido para el tratamiento. En México, se encontró *bla*_{CTX-M-15} en plásmidos de *K. pneumoniae* con *qnrB* (243). Se han descrito casos de *K. pneumoniae* que albergan *bla*_{CTX-M-15} y *aac(6)-Ibcr* en diferentes regiones del mundo (244), y se sugirió que poseían un aumento de la eficacia biológica debido a la presencia de *bla*_{CTX-M-15} (245). Por lo tanto, los clones epidémicos de *K. pneumoniae* poseen diferentes modos de resistencia a las quinolonas que pueden ser evolutivamente importantes. Los aislamientos pertenecientes a los clones epidémicos, como *K. pneumoniae* ST11, ST15 y ST147, a menudo poseen dos o tres sustituciones en GyrA y ParC que causan

resistencia junto con la presencia del gen RQMP *aac(6)-Ib-cr* (245). En el caso del clon *K. pneumoniae* ST258 se describió la presencia de *oqxAB* junto con la pérdida de porinas (89,91).

2.5. Resistencia a la colistina.

La colistina es un polipéptido bactericida perteneciente a la familia de las polimixinas. La colistina se une a los lipopolisacáridos y fosfolípidos de bacterias Gram negativas y desplaza competitivamente los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) de los grupos fosfato de los lípidos de la membrana, lo que conduce a la ruptura de la membrana celular externa y finalmente la lisis celular (246). Debido a su conocida toxicidad, la colistina ha tenido un uso restringido en medicina entre el año 1980 y el 2000 lo que redujo la aparición de resistencias. A principios del año 2000, con la creciente aparición de cepas de *K. pneumoniae* XDR productoras de carbapenemasas, la colistina se utilizó como antibiótico de último recurso (246,247). El primer brote hospitalario de *K. pneumoniae* MDR resistente a la colistina se detectó en 2004 en Grecia (247), y desde entonces han surgido un número creciente de aislamientos de cepas resistentes a la colistina en el ámbito clínico. La estrategia más común de resistencia a la colistina son las modificaciones de la membrana externa bacteriana mediante la alteración del lipopolisacárido y la reducción de su carga negativa.

Estos cambios en el lipopolisacárido se producen tanto por mutaciones en el gen *lpxM* y su regulador *ramA*, responsables de la maduración del lípido A (248,249), así como por la neutralización del lípido A mediante la unión adicional de amino arabinosa ,asociado a *pbgP* y *pmrE*, de fosfoetanolamina, asociada a *pmrC* o de palmitato, asociada a *pagP* (250,251). Otros genes reguladores de la modificación del lipopolisacárido, como *phoPQ*, *pmrA* y *pmrD*, están también implicados en el

desarrollo de resistencia a colistina. Las mutaciones en uno de los dos genes reguladores que da lugar a la sobreexpresión de *pmrB* (252), o a la desactivación de *mrgB* (253), también son suficientes para causar resistencia a la colistina. Otra posible vía de modificación del lipopolisacárido implica a la glicosiltransferasa TupA-like y al sistema regulador CrrAB (254). Otros mecanismos descritos en el desarrollo de resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* son los polisacáridos de la cápsula, que pueden enmascarar moléculas cargadas en la membrana externa, así como dar lugar a una mayor expresión de las bombas de expulsión AcrAB-TolC y KpnEF (255) debido a la regulación positiva de su transcripción mediante RarA (256). Una delección en la glicosiltransferasa WcaJ en *K. pneumoniae* produce en la cepa mutante una pérdida del fenotipo mucoso que da lugar a un incremento en la resistencia a la colistina (257).

La resistencia a la colistina mediada por plásmidos se notificó recientemente, con la identificación del gen *mcr-1* en China (258). Este gen codifica una enzima de la familia de la fosfoetanolamina transferasa que modifica el lípido A incorporando fosfoetanolamina, de forma similar a PmrC (91,258).

2.6. Resistencia a la tigeciclina.

La tigeciclina es la primera glicilciclina lanzada al mercado (259), y se utiliza en la lucha frente a las infecciones por *K. pneumoniae* desde 2005, ya que evade los principales mecanismos de resistencia a las tetraciclinas (260). La tigeciclina muestra una actividad de amplio espectro incluso frente a cepas productoras de BLEE (261). Los mecanismos de resistencia conocidos frente a este antibiótico están codificados cromosómicamente, e incluyen modificaciones de las unidades ribosómicas 30S y 16S, dianas del antibiótico, así como cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana (262). También se demostró que la sobreexpresión de las bombas de

expulsión AcrAB-TolC y OqxAB así como las alteraciones en los niveles de expresión de sus reguladores RarA, RamA, RamR y AcrR pueden producir resistencia a tigeciclina (262). Una disminución en la transcripción del gen que codifica la porina OmpK35 produce disminución de la sensibilidad a la tigeciclina (263). La primera mutación en una proteína ribosómica que daba lugar a resistencia a tigeciclina se observó en la proteína S10, codificada por *rpsJ* (264). Se han identificado genes *tetA* en aislamientos de *K. pneumoniae*. Estos genes codifican bombas de expulsión que tienen como sustrato las tetraciclinas, sin embargo su papel en la resistencia no está claro (91,265).

3. Patogénesis en *Klebsiella pneumoniae*.

K. pneumoniae emplea muchas estrategias para incrementar su invasividad y protegerse de la respuesta inmunitaria del huésped. Sin embargo, muchos de estos factores aún no se han caracterizado en profundidad y queda mucho trabajo por hacer para comprender plenamente sus mecanismos de acción y su importancia clínica. Los factores de virulencia caracterizados en *K. pneumoniae* desempeñan diversas funciones en los distintos tipos de infección y en las diferentes cepas. Analizando los factores de virulencia conocidos hasta la fecha y sus implicaciones, parecen tener un papel más defensivo que ofensivo, dirigiéndose más a una protección frente a la respuesta inmunitaria del huésped que a un ataque frente a este (34).

En este apartado nos vamos a centrar en factores de virulencia como son la producción de la cápsula, el lipopolisacárido, los sideróforos, las fimbrias y los sistemas de secreción.

3.1. Cápsula.

Las cepas de *K. pneumoniae*, especialmente los aislamientos clínicos, producen con frecuencia una cápsula viscosa de polisacáridos. Esta cápsula es la capa más externa de la célula, que protege a la bacteria de la desecación, de los fagos y de la depredación de los protistas (266,267). La cápsula es también un determinante clave de la virulencia. A diferencia de las cepas capsuladas, las cepas isogénicas no capsuladas son incapaces de causar enfermedad en modelos de infección murinos (268,269). Además, se ha demostrado que la cápsula suprime la respuesta inflamatoria del hospedador (270) y proporciona resistencia a los inmunopéptidos antimicrobianos (271), a la muerte mediada por el complemento (272) y a la fagocitosis (266,273,274). En *Klebsiella pneumoniae* se han descrito 77 tipos de cápsula inmunológicamente distintos (tipos K) definidos por serología (275–277). Sin embargo, la tipificación serológica requiere técnicas y reactivos especializados que no están al alcance de la mayoría de los laboratorios de microbiología, por lo que se aplica muy raramente. Además, entre el 10 y el 70% de los aislamientos de *K. pneumoniae* no son tipificables serológicamente, porque expresan una cápsula nueva, algo que es común para los aislamientos clínicos, o no están encapsulados (278–281)

La cápsula se produce a través de un proceso dependiente de Wzy para el cuál la maquinaria conservada está codificada por genes que están presentes en la mayoría de los loci de biosíntesis del antígeno K (*wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx* y *wzy*) (267,282). Esta región es muy variable y codifica las proteínas de síntesis, procesamiento y exportación de azúcares específicos de la cápsula, además de los componentes de ensamblaje del núcleo Wzx (flipasa) y Wzy (polimerasa que une las unidades de repetición de la cápsula) (281,282). Hasta la fecha, se han identificado más de 138 combinaciones distintas basadas en esta región (98,281,283). Cada una de ellas define

un locus K distinto que se cree que codifica un tipo de cápsula distinto. Sin embargo sólo 77 de ellas se han descrito mediante los métodos de tipificación serológica tradicional (277). Los tipos de cápsula K1 y K2 son los serotipos más comunes en las cepas de *K. pneumoniae* hipervirulenta que están asociadas con infecciones invasivas y una mayor patogenicidad en modelos murinos (9). Estos tipos capsulares están muy conservados en los clones hipervirulentos (K1 en el CG23 y K2 en los demás) (67,75,131,284). El tipo de cápsula K5 también se asocia con el absceso hepático (131), y el K3 está restringido al linaje de *K. pneumoniae* que produce rinoscleroma (ST67)(69). Se sabe poco sobre la virulencia relativa de otros tipos de cápsula. La mayoría de los clones no hipervirulentos, incluidos los clones MDR globales, presentan una amplia diversidad del locus K (75,79) a excepción del CG307. Este grupo clonal muestra siempre un locus K102 (KL102), así como un locus adicional de síntesis de cápsula que tiene una estructura distinta al K-locus y es raro en la población más amplia de *K. pneumoniae* (92).

La producción de la cápsula puede aumentar por encima de los niveles basales de varias maneras. Por un lado, se puede producir un aumento de la producción de la capsula mediado por los reguladores del fenotipo mucosoide A, *rmpA*, y el *rmpA2*, que son de origen plasmídico, o bien, mediante la copia cromosómica del *rmpA* (285–288). Por otro lado, también se puede aumentar la producción de la capsula mediante la regulación producida por los genes de síntesis de la cápsula A y B (*rcaA* y *rcaB*) o en respuesta a señales externas (253,255–257). Por ejemplo, el aumento de la concentración de glucosa provoca un aumento de la producción de cápsula mediado por el gen *rmpA*. Por otro lado, las concentraciones relativamente altas de hierro extracelular provocan una disminución en la producción de la cápsula debido a la inhibición de *rmpA* a través de genes asociados con los sistemas de adquisición de

hierro (292,293). La producción de la capsula también puede ser desencadenada en ausencia de *rmpA* o *rmpA2* por el gen cromosómico *magA* (34,294).

3.2. Lipopolisacárido.

El lipopolisacárido, también conocido como endotoxina, es un componente principal y necesario de la membrana externa de todas las bacterias gram-negativas. Aunque existe una considerable variación en las estructuras del lipopolisacárido entre las especies bacterianas, normalmente está compuesto por un antígeno O, un oligosacárido central y el lípido A. El lipopolisacárido es tanto un beneficio como un obstáculo para *K. pneumoniae* durante la infección, ya que es un importante factor de virulencia que protege al patógeno frente a las defensas humorales, pero también puede ser un fuerte activador inmunológico (34). Su antígeno O sobresale de la superficie bacteriana y se ha demostrado que protege a la bacteria frente a la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos (295). La modificación de los lípidos A, en respuesta a los diferentes microambientes del hospedador, se cree que ayuda a las bacterias a eludir la respuesta inmune, a promover la resistencia a los péptidos antimicrobianos y a alterar las propiedades de la membrana externa (296,297).

Con una sola excepción, los determinantes clave del antígeno O están colocados en el locus O (anteriormente conocido como locus *rfb*) (298–301), habiéndose identificado hasta la fecha 12 loci distintos (283,298). Aunque se han reconocido 10 antígenos O serológicamente distintos, muchos aislamientos no son tipificables (302,303). Los antígenos más comunes entre los aislamientos clínicos son el O1 y O2 (283,302,303) y pueden proporcionar una protección mayor frente a la fagocitosis (281,283). Curiosamente, los antígenos O1 y O2 están codificados por los mismos dos loci O, el O1/O2. Es la presencia o ausencia de otros dos genes en otras

partes del genoma, *wbbY* y *wbbZ*, lo que determina el antígeno específico. Cuando ambos genes están presentes, se produce D-galactán II, dando lugar al antígeno O1. Cuando están ausentes, el resultado es el antígeno O2 (304,305).

3.3. Sideróforos.

K. pneumoniae necesita el hierro como nutriente para el desarrollo de una infección.. Normalmente, existe poco hierro libre en el plasma del hospedador, ya que está unido a moléculas de transporte de hierro como la transferrina. Además, los niveles de hierro disminuyen durante el transcurso de una infección al unirse a la lactoferrina, que es una proteína de defensa innata presente en los fluidos corporales (306,307). Por lo tanto, *K. pneumoniae*, al igual que muchos otros patógenos bacterianos, compete con las células del hospedador en la obtención del hierro. En este contexto, estas bacterias patógenas han desarrollado estrategias eficientes para adquirir hierro del hospedador con el fin de sobrevivir y propagarse durante la infección. La estrategia predominante es la secreción de sideróforos.

Los sideróforos son moléculas con una alta afinidad por el hierro, incluso mayor a la de las proteínas de transporte del propio hospedador, pudiendo robárselo o obtenerlo del entorno (307). Las cepas de *K. pneumoniae* codifican varios sideróforos, y la expresión y la contribución de cada uno de ellos a la virulencia varía. La producción de más de un sideróforo puede favorecer la colonización exitosa por parte del patógeno de diferentes tejidos y/o evitar su neutralización por el hospedador (307,308). Los distintos sideróforos presentes en *K. pneumoniae* son la enterobactina, la yersiniabactina, la salmochelina y la aerobactina (34).

3.3.1. Enterobactina.

La expresión de la enterobactina se produce en casi todas las cepas de *K. pneumoniae*, tanto en cKp como en hvKp, por lo que se considera que es el principal sistema de captación de hierro utilizado por *K. pneumoniae* (309–312). Su afinidad por el hierro es la más alta de todos los sideróforos presentes en *K. pneumoniae* (313,314). Los genes necesarios para su biosíntesis se encuentran en el cromosoma en el clúster *entABCDEF*, mientras que *fepABCDG* codifica las proteínas que median su transporte, siendo *fepA* el que codifica el receptor de captación (34,315,316).

3.3.2. Yersiniabactina.

La yersiniabactina se descubrió originalmente en *Yersinia* en la que formaba parte de una isla de patogenicidad. Desde entonces este sideróforo se ha identificado en otras bacterias, incluida *K. pneumoniae* (317). La yersiniabactina se ha identificado en la inmensa mayoría de los aislamientos (90%) de hvKp , lo que sugiere un importante papel en la virulencia de estas cepas. Sin embargo, sólo el 18% de los aislamientos clínicos de cKp son portadores de este factor de virulencia (316,318). Las proteínas necesarias para la síntesis de la yersiniabactina están codificadas por los genes *irp*. Los genes *ybt* y *fyu* codifican de los transportadores necesarios para su secreción y el gen *ybtQ* codifica el receptor de captación (34,316,317,319).

3.3.3. Salmochelina.

La salmochelina es una forma c-glucosilada de la enterobactina (315). Sólo de un 2% a un 4% de las cepas cKp son portadoras de este sideróforo. Sin embargo, al igual que la yersiniabactina, es mucho más frecuente en las cepas hvKp, dónde se ha detectado su presencia en el 90% de los aislamientos asociados a abscesos hepáticos piógenos (311,316,318). La síntesis, secreción y captación de la salmochelina se lleva

a cabo por las enzimas codificados por *iroBCDEN*, siendo *iroN* el gen que codifica el receptor (34,315,320,321).

3.3.4. Aerobactina.

La aerobactina es un sideróforo de citrato-hidroxamato, y su afinidad por el hierro es la más baja dentro de los sideróforos descritos en *K. pneumoniae* (313,314). Se encuentra solamente en el 6% de las cepas cKp, pero está presente entre el 93-100% de los aislamientos de hvKp (309,311,322,323). La presencia de aerobactina está significativamente asociado a la hipercápsula, aunque no todas las cepas hipercapsuladas poseen este sideróforo (307,322,323). Esta asociación se debe al hecho de que el clúster de genes que codifica la producción de la aerobactina, el *iucABCD*, junto con el receptor, *iutA*, se encuentran en el mismo plásmido de virulencia que lleva *rpmA*, un potenciador de la producción de la cápsula (34,324).

3.4. Metabolismo de la alantoína.

El metabolismo de la alantoína es un método por el que las bacterias pueden obtener carbono y nitrógeno de su entorno (325). Se identificó el operón *allABCD* en una búsqueda de genes hiperexpresados en cepas hvKp en comparación con las cepas cKp, por lo que probablemente sea un factor de virulencia relevante para estas cepas. Este operón contiene genes implicados en el metabolismo de la alantoína. Se ha demostrado que la inactivación del gen *allS*, que regula positivamente el operón *allABC*, reduce de manera significativa la virulencia de cepas hvKp en un modelo de infección gástrica (326). La presencia de este operón es mayor en las cepas asociadas a abscesos hepáticos (34,327,328).

3.5. Sistemas de secreción.

Para interactuar con el medio externo, las bacterias deben secretar proteínas a la superficie celular o al medio externo. En las bacterias gram-negativas, la presencia de una membrana externa supone un obstáculo adicional para la secreción de macromoléculas al exterior de la célula. Sin embargo, han desarrollado diferentes vías para translocar proteínas a través de la envoltura celular. En la actualidad, existen nueve sistemas de secreción "oficiales" en gram-negativos, designadas con números del I al IX, así como los sistemas chaperona-usher pili (*chaperone-usher pili*; CUP) (329). Las enterobacterias utilizan muchos de estos sistemas para exportar toxinas o incluso para inyectarlas directamente en el citoplasma de la célula hospedadora. Estas toxinas se denominan, generalmente, "efectores", y son secretadas por los sistemas de secreción de tipo III, de tipo IV y de tipo VI (*type VI secretion system*; T6SS). Además, las enterobacterias dependen de las adhesinas para interactuar con el hospedador o con el medioambiente. Las adhesinas son generalmente secretadas por los sistemas de secreción de tipo V (*type V secretion system*; T5SS), por los sistemas de secreción de tipo II o ensambladas por los sistemas CUP (330). De todos estos sistemas de secreción describiremos en más detalle los T5SS, los T6SS y los sistemas CUP (331).

3.5.1. Sistemas de secreción tipo V.

Los T5SSs son los sistemas de secreción más simples y extendidos entre las bacterias gram-negativas (332). Están compuestos por una o dos proteínas centrales. Las proteínas efectoras (dominios pasajeros) son transportados por el poro de secreción (dominio de translocación) a través de la membrana externa a la superficie celular (333). A menudo son denominados autotransportadores, debido a que constituyen sistemas de secreción autónomos (334). Sin embargo, se ha demostrado

que los T5SS dependen de varios sistemas bacterianos como el translocón Sec, las chaperonas periplásmicas y el sistema de ensamblaje del barril β en la membrana externa (331,333,335). Actualmente hay cinco subclases reconocidas en los T5SS, los sistemas de secreción Va, Vb, Vc, Vd y Ve. En los subtipos Va, Vc, Vd y Ve, el dominio pasajero está fusionado con el dominio de translocación. Este último es necesario y suficiente para la secreción del dominio pasajero, de ahí el nombre genérico de "autotransportadores" (336,337). En el subtipo Vb en cambio, la proteína efectora, denominada genéricamente TpsA, está separada de su transportador, el TpsB. Por lo tanto, en el caso de los T5SSs Vb, un transportador TpsB puede tener más de un efector, aunque no ocurre frecuentemente (338). Los T5SSs Vb, son también conocidos como sistemas de secreción de dos componentes (*two partner secretion; TPS*) y son los T5SSs en los que nos vamos a centrar a continuación.

3.5.1.1. Sistemas de secreción de dos componentes.

Los sistemas TPS se componen fundamentalmente de dos proteínas, una que funciona como translocador, TpsB, y otra como pasajero, TpsA. Las proteínas TpsB son proteínas de β -barril de 16 cadenas con dos dominios POTRA asociados al transporte de polipéptidos periplásmicos. Las proteínas TpsA son más diversas, pero casi todas se pliegan en estructuras principalmente β -helicoidales (339). El extremo N-terminal de las proteínas tipo TpsA contiene un dominio altamente conservado de aproximadamente 300 residuos, designado como dominio TPS (340). El dominio TPS de esta proteína interactúa con el dominio POTRA de la proteína TpsB para su secreción. Después, la proteína TpsA puede permanecer unida a la superficie bacteriana o ser liberada al medio extracelular (Figura 5)(341). En distintos patógenos gram-negativos, se ha demostrado el papel de las proteínas TpsA como factores de virulencia relacionados con la adherencia (342–345), la adquisición de hierro (346), la

inhibición de la fagocitosis (347–349). También se ha demostrado un papel relevante en la competencia bacteriana a través de la inhibición de crecimiento por contacto directo (350,351) y en la virulencia en modelos animales (342). En *K. pneumoniae* no se han descrito todavía la implicación de los sistemas TPS en virulencia, pero si se ha cristalizado la proteína efectora CdiA, implicada en la inhibición del crecimiento dependiente del contacto en *E. coli*. En este estudio se observó que la estructura y actividad de la toxinas CdiA, de *E. coli* y de *K. pneumoniae*, reflejaban una convergencia funcional (352). Otro sistema de dos componentes que también fue encontrado en aislamientos de *K. pneumoniae* pertenecientes al CG23 fue el *kvgAS*. Este sistema parece estar implicado en la respuesta al estrés causado por los radicales libres y en la detección de las condiciones de limitación del hierro (353).

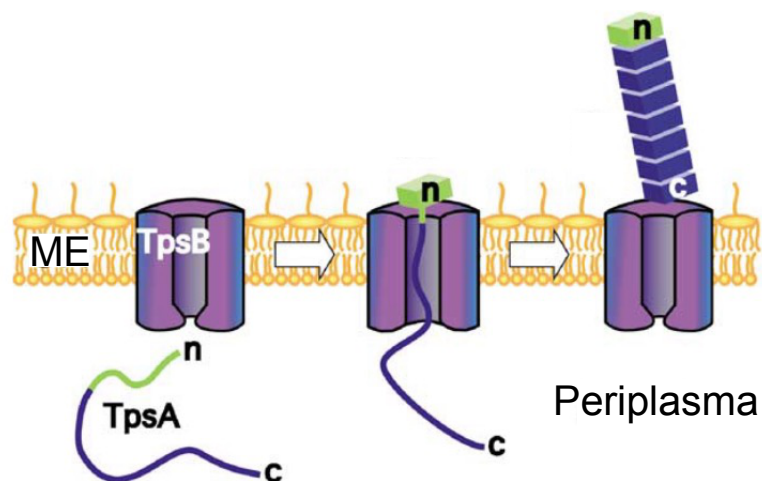


Figura 5. Modelo de translocación de los sistemas TPS. ME: membrana externa. Figura adaptada de Thanassi y colaboradores, *Mol Membr Biol*, 22 63-72 (2005).

3.5.2. Sistemas de secreción de tipo VI.

Los T6SSs son complejos transmembrana que se utiliza para suministrar proteínas efectoras a una gran variedad de células, incluyendo células eucariotas u otras bacterias. Curiosamente, las T6SSs comparten homología estructural con las colas de los fagos, y se ha planteado la hipótesis de que los T6SSs pueden haber surgido de colas de fagos invertidas que expulsan proteínas fuera de la bacteria en lugar de inyectarlas dentro (354). El mecanismo de acción es similar al utilizado por los fagos en la contracción de la cola, inyectando en la célula diana una aguja cargada de efectores (355). Este sistema se describió por primera vez en *Rhizobium leguminosarum* como un grupo de genes (*imp*) de fijación de nitrógeno alterada (356). Un T6SS funcional está compuesto por 13 genes conservados en el genoma central, denominados *tssA-M* (357). Los componentes del T6SS se ensamblan en un aparato contráctil en forma de aguja que transloca los efectores a las células vecinas (358). Están compuestos de un complejo transmembrana unido a una placa en la base y a una estructura tubular citoplasmática de cola larga rodeada por una vaina contráctil. La contracción de la vaina impulsa el tubo interior a través de la membrana hacia la célula diana. Las proteínas efectoras son transportadas por la punta del T6SS y/o los componentes tubulares y se liberan una vez se desmonta el tubo dentro de la célula diana (359).

Hasta ahora, la función del T6SS en *K. pneumoniae* es poco conocido. Se han encontrado los 13 genes conservados (*tssA-M*) en el genoma bacteriano organizados en tres loci contiguos. Estos loci fueron designados locus I, locus II y locus III en base al parentesco genético con los ortólogos con los que fueron comparados (360). En algunas cepas de *K. pneumoniae*, los genes del T6SS se agrupan en 2 loci, mientras que en otras lo hacen en 3 (360–362). Estos 13 genes codifican la maquinaria necesaria

para la secreción del sistema. Están organizados en 2 segmentos que se mantienen en todas las cepas y se alternan en los loci con distinto grado de integridad y organización. El primer segmento contiene un grupo de 8 genes, el *vgrG/clpV/hcp/ompA/dotU/impJ/impC/impB*, que se denomina *vgrG* y el segundo segmento está formado por los genes *icmF/impG/impH/sciN/impF* y se denomina *icmF* (Figura 6.). Las proteínas de la familia de la multiplicación intracelular F (IcmF) son proteínas integrales conservadas de la membrana interna del T6SS, y están implicadas en la entrega de proteínas efectoras en las células diana (363). Aunque se desconocen las funciones exactas de la mayoría de las proteínas del T6SS, se sabe que ClpV/TssH es una ATPasa AAA+ citoplasmática que permite el reciclaje de la maquinaria T6SS. Además, aunque muchas no son secretadas, son necesarias para la secreción de sustratos del T6SS como la proteína regulada por la hemolisina (Hcp/TssD) y la proteína de repetición de valina-glicina (VgrG/TssI) (Figura 4)(364,365). Algunos estudios sugieren la existencia de un mecanismo organizado del T6SS que probablemente juegue un papel en la interacción patógeno-hospedador en *K. pneumoniae*. Estudios previos han demostrado que cepas de *K. pneumoniae* con mutaciones en las proteínas centrales del T6SS mostraron una disminución en la habilidad de infectar el bazo en modelos animales (269). Además, se ha descrito la implicación de estos sistemas en la competencia bacteriana, en la invasión celular, en la expresión de fimbrias de tipo 1 y en la colonización in vivo (366,367).

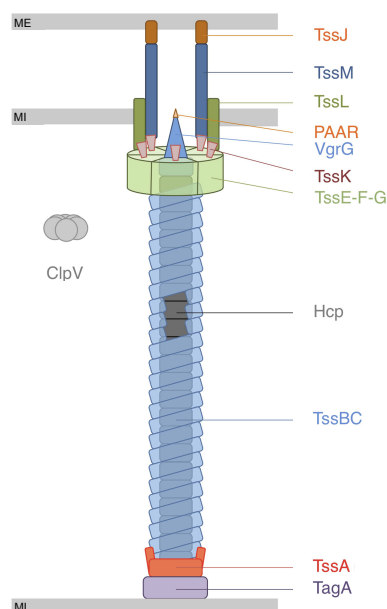


Figura 6. Representación esquemática del T6SS y sus distintas subunidades. IM, membrana interna; OM, membrana externa. Figura adaptada de Cherrak Y y colaboradores, *Microbiol Spectr*, 7 (2019).

3.5.3. Sistemas Chaperona-usher pili.

Los sistemas CUP se utilizan para ensamblar y secretar apéndices de múltiples subunidades denominados pili o fimbrias. Éstos están implicados en el reconocimiento y la adhesión de la célula hospedadora. y contribuyen positivamente a la patogenicidad y a la formación de *biofilm* (368). Estos sistemas CUP están formados por un gen que codifica un *usher*, al menos un gen que codifica una chaperona y al menos un gen que codifica una fimbria o pilus. Las chaperonas y el *usher* son proteínas relativamente conservadas necesarias para ensamblar las fimbrias y secretarlas. Los sistemas CUP se clasifican en base la proteína *usher*, ya que las chaperonas y subunidades del pilus son variables en número y estructura. En esta clasificación encontramos los clados α -, β -, γ -, κ -, π -, y σ -, dónde cada uno de los cuales procede de un ancestro común (369). El clado de las fimbrias γ - se subdivide a su vez en cuatro subclados, denominados $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ -, $\gamma 3$ - y $\gamma 4$ -. Los nombres de los clados fimbriales α -, κ -, π - y σ - se asignaron en

base a características de un miembro destacado o a características particulares del clado. Sin embargo, las fimbrias β - y γ - se les asignaron los nombres por orden alfabético. Otro modo de clasificación de los sistemas CUP se basa en la estructura de las chaperonas (370). Esta clasificación da lugar a dos grupos: la subfamilia de chaperonas que ensambla estructuras superficiales no fimbriales, y la subfamilia de chaperonas que ensambla filamentos fimbriales (370,371). Dentro de la clasificación de los clados basados en el *usher*, la primera subfamilia de chaperonas forman parte únicamente del clado γ_3 ; sin embargo, la segunda subfamilia de chaperonas se incluyen dentro de los clados β -, γ_1 -, γ_2 -, γ_4 -, κ - y π (372).

Se demostró que la clasificación de los clusteres de genes fimbriales en clados basada en las secuencias de *usher* se correlaciona con la organización de los genes principales. Los seis clados establecidos pueden subdividirse en cuatro clusteres principales basados en su organización génica y en la relación evolutiva de su pilus. El primer grupo es el grupo $\gamma\kappa\pi$, que contiene los clados γ , κ y π . Este clúster se caracteriza por un dominio común de homología de la subunidad del pilus. Además, los clados π y κ comparten una estructura central compuesta por genes que codifican primero una subunidad mayor, representada por una M, luego un *usher*, representado por una U, y finalmente de una chaperona, representada con una C, dando lugar a una estructura central MUC. El clado γ no comparte la misma organización de genes y esta estructura es diferente para cada subclado: MCUT para γ_1 , MCCU para γ_2 , MCU o CUM para γ_3 y MCUT para γ_4 , donde la T representa la adhesina de la punta. Los clados α , β o σ muestran una organización génica distinta: CMUT, MCU y MCUT, respectivamente. Además, estos tres grupos también contienen dominios de homología de la subunidad fimbrial distintos. Esto sugiere que la diversidad en la organización de los genes encontrada dentro de cada clado no implica una transferencia horizontal de

los genes de las subunidades entre estos cuatro grupos principales, sino que co-evolucionaron como grupos completos. Las divergencias con respecto a la estructura génica central, por ejemplo, cuando hay más de una chaperona dentro de un clúster de genes fimbriales, podrían explicarse por un probable evento de duplicación génica (369).

Los sistemas CUP mejor caracterizados son los pili de tipo 1 y los P pili. Estos sistemas son utilizados por las bacterias uropatógenas para colonizar e infectar el tracto urinario (368). Ambos están implicados en las interacciones patógeno-hospedador y son importantes tanto en el desarrollo de la infección como en la formación de *biofilm* (373). Tanto el P pilus como el pilus tipo 1 están formados por varias subunidades organizadas en dos subconjuntos distintos: la punta y el cuerpo del pilus. El ensamblaje se inicia con la secreción de las subunidades del pilus al periplasma a través del sistema SecYEG, donde se pliegan para luego estabilizarse mediante la interacción específica con una chaperona. El complejo chaperona-pilus se une al *usher*, que es un poro de β -barril de 24 hebras compuesto por un dominio N-terminal, dos dominios C-terminales y un dominio de conexión. El *usher* cataliza la liberación de la chaperona y la secreción del pilus al exterior (Figura 7) (329).

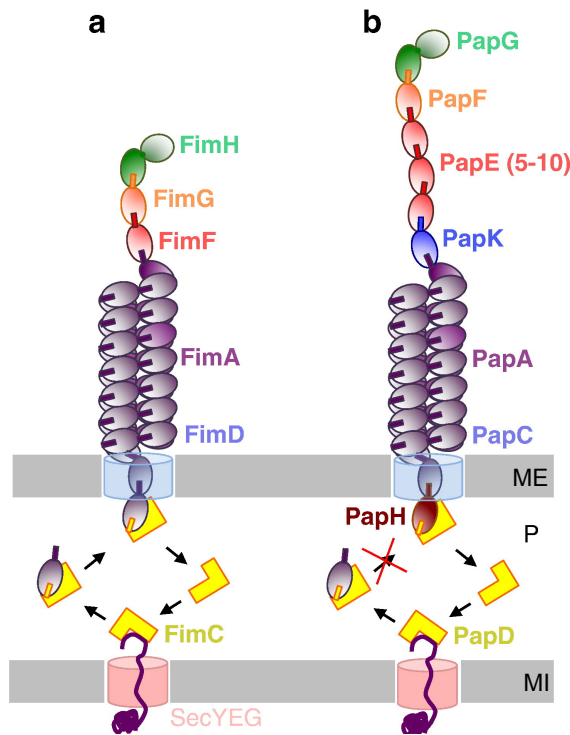


Figura 7. Estructura general de los pili de tipo 1 (a) y de tipo P (b). Figura adaptada de Lillington J. y colaboradores, *Biochim Biophys Acta*, 1840 2783-96 (2014).

Los sistemas CUP representan otra clase de factores de virulencia de *K. pneumoniae* y son importantes mediadores de la adhesión. En *K. pneumoniae*, las fimbrias de tipo 1 y 3 son las principales estructuras adhesivas que se han caracterizado como factores de patogenicidad, aunque han llegado a identificarse hasta nueve diferentes en una sola cepa incluyendo las fimbrias de tipo 1 y 3 (34,374,375).

3.5.4. Fimbrias de tipo I.

Las fimbrias de tipo 1 son protuberancias delgadas, en forma de hilo, ubicadas en la superficie de la bacteria. Se expresan en la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae*, tanto clínicos como ambientales. El clúster de genes del sistema CUP de tipo 1 de *K. pneumoniae* es homólogo al de *E. coli* (Figura 8.)(376). La subunidad FimA constituye la mayor parte de la estructura, mientras que las propiedades

adhesivas son atribuidas a la subunidad menor, FimH, que se encuentra en la punta (376–379). Otros genes del clúster incluyen los que codifican las subunidades estructurales menores FimF y FimG. La chaperona es codificada por el gen *fimC*, mientras que *fimD* codifica el *usher*. El gen *fimI* codifica un producto necesario para las fimbrias de tipo 1, pero todavía no está caracterizado. En *K. pneumoniae* este operón porta un gen que no está presente en el operón homólogo de *E. coli* (*fimK*). Este gen está implicado en la regulación de las fimbrias de tipo 1, ya que su inactivación provoca la pérdida de expresión de las fimbrias de tipo 1 (376,380). Las fimbrias de tipo 1 de *K. pneumoniae* se unen a glicoproteínas D-manosiladas y, por tanto, esta unión se denomina con frecuencia unión "sensible a la manosa" (34,381,382).

El papel de las fimbrias de tipo 1 se centra especialmente en las infecciones del tracto urinario (383), potenciando la adherencia a las células del hospedador y contribuyendo a la formación de *biofilm*, incluso en los catéteres urinarios (384,385).

3.5.5. Fimbrias de tipo 3.

Las fimbrias de tipo 3 son filamentos en forma de hélice. De manera similar a la de las fimbrias de tipo 1, las fimbrias de tipo 3 se expresan en casi todos los aislamientos de *K. pneumoniae*. Están organizadas genéticamente en tres unidades transcripcionales: el operón policistrónico *mrkABCDF*, el operón bicistrónico *mrkHI* y el gen *mrkJ* (Figura 8.). La formación de las fimbrias de tipo 3 depende de la expresión del operón *mrkABCDF* (386,387), siendo MrkA la subunidad principal del pilus y MrkD la adhesina situada en la punta (379). Las subunidades MrkB y MrkC están implicadas en el ensamblaje y la regulación de la expresión, mientras que MrkF participa en la estabilidad de las fimbrias en la superficie (388). MrkH es una proteína reguladora codificada en el operón *mrkHI*, que regula positivamente el gen *mrkA* y su

propia expresión (389–391). La proteína MrkH contiene un dominio PilZ, cuya interacción con el c-di-GMP es crucial para su papel como activador transcripcional (392). El operón *mrkHI* también codifica MrkI, un regulador transcripcional de tipo LuxR que actúa como coactivador de la expresión de *mrkA* (389,393). El gen *mrkJ* codifica una fosfodiesterasa que degrada el c-di-GMP, que a su vez, controla la actividad de MrkH (394). Las fimbrias de tipo 3 son "insensibles a la manosa", por lo tanto no se unen a esta. Aunque todavía no se ha encontrado un receptor de superficie celular específico para las fimbrias de tipo 3, se ha demostrado que se unen a proteínas de la matriz extracelular como el colágeno de tipo IV y V (395).

Las fimbrias de tipo 3 promueven la adhesión a distintos tipos celulares aunque tienen un papel clave desde un punto de vista clínico en la formación de *biofilm* (385,395–397).

3.5.6. Otras fimbrias.

Además de las bien caracterizadas fimbrias de tipo 1 y 3, otros sistemas CUP han sido identificados en *K. pneumoniae*. Se encontró una isla de patogenicidad en la cepa *K. pneumoniae* KR116, denominada KpGI, que codifica un clúster de fimbrias γ 1-chaperonas/*usher*, denominado fim2, compuesto por 8 genes que muestran similitud de secuencia e identidad organizativa con los operones fim de *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (~60%) y *K. pneumoniae* C3091 (~51%) (Figura 8.). No se identificó ninguna función obvia *in vitro* o *in vivo*, aunque se observaron indicios de su participación en la urovirulencia y la diseminación bacteriana desde el tracto respiratorio (74).

Por otra parte, se ha identificado un homólogo del operón *ecpABCDE* de *E. coli* en el genoma de *K. pneumoniae* (Figura 8.). El 96% de las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas contienen el gen *ecpA* y el 94% producían el sistema ECP

durante la adhesión a células epiteliales. Además, el 80% de las cepas que formaban *biofilm* sobre vidrio producían el sistema ECP, lo que sugiere que el sistema ECP es necesario, al menos *in vitro*, para la producción de *biofilm* y la adhesión a células epiteliales (398).

Otros 7 clusters de genes fimbriales fueron encontrados en el genoma de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Se denominaron fimbrias Kpa, Kpb, Kpc, Kpd, Kpe, Kpf y Kpg (Figura 8.). Se observó que los genes *kpc* estaban altamente asociados a los aislamientos del serotipo K1 y producían un aumento de la formación de *biofilm* (375).

Un nuevo clúster fue detectado en la cepa *K. pneumoniae* LM21, al que se denominó Kpj (Figura 8.), implicado en adherencia y colonización intestinal en modelos animales. En esta cepa también se observó la implicación del operón Kpg, en la formación de *biofilm*, la adherencia a células eucariotas y la colonización intestinal. Sin embargo, los operones Kpa y Kpe estaban implicados en la formación de *biofilm* y adherencia. En la cepa *K. pneumoniae* LM21 no se ha identificado ninguna función clara de los operones Kpb y Kpd (374).

Todas

Una fimbria expresada en 30 de los 78 aislamientos estudiados por Di Martino P y colaboradores fue la llamada KPF-28. Esta fimbria está implicada en la adherencia de *K. pneumoniae* a líneas celulares eucariotas intestinales, lo que sugiere su implicación en la colonización del tracto gastrointestinal (399).

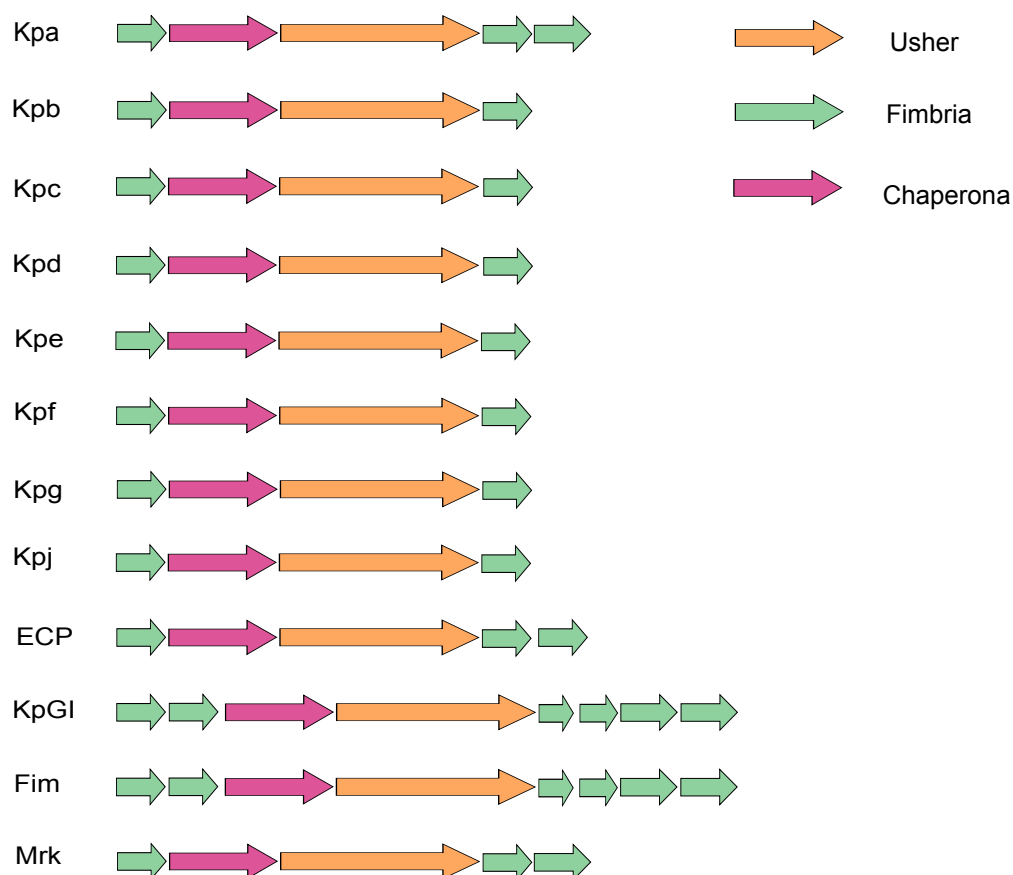


Figura 8. Estructura de los distintos sistemas CUP.

4. Colonización intestinal y estrategias de descolonización.

La colonización gastrointestinal con *K. pneumoniae* es un reservorio común y muy significativo para la transmisión y posterior infección de los pacientes (93,400,401). El 16,5% de las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas son posteriores a la colonización, lo que pone de manifiesto una clara relación entre colonización e infección (402). En segundo lugar, los portadores pueden servir como un importante reservorio para la diseminación de CPKp (125,403–405). Aunque la colonización con clones de alto riesgo está asociada principalmente a los hospitales, ya se han observado casos de individuos colonizados en la comunidad (16,180). La colonización observada de individuos sanos con diversas cepas durante

cortos periodos de tiempo difiere de la situación observada en los hospitales, donde los pacientes son colonizados durante largos periodos de tiempo con clones resistentes específicos debido al tratamiento con antibióticos (400). En este contexto, se han establecido programas de vigilancia epidemiológica para identificar a pacientes colonizados por CPKp con el objetivo de controlar su propagación en el entorno sanitario (406–408).

La erradicación de cepas resistentes de la flora intestinal se denomina descolonización. La descolonización tiene muchos beneficios como reducir el riesgo de que el portador individual desarrolle una infección debido a la cepa resistente o prevenir la propagación de la bacteria a otros pacientes, proceso denominado transmisión cruzada. Además, la colonización juega un papel importante como reservorio de elementos genéticos móviles para otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Por lo tanto, la descolonización podría limitar la posibilidad de que la transferencia horizontal de genes confiera resistencia a otras bacterias del tracto intestinal (408,409).

El proceso de descolonización es complicado. Puede producirse de forma espontánea, sin embargo, el tiempo necesario para que esto ocurra es muy variable llegando a mantenerse en algunos casos durante más de dos años (408,410,411).

Como métodos de descolonización intestinal se han utilizado antibióticos orales no absorbibles. Sin embargo, el éxito de este tratamiento ha sido limitado debido al rechazo de los pacientes, al fracaso del propio tratamiento, a las recaídas y/o al desarrollo de resistencia a los antibióticos durante el tratamiento (408,410).

Los probióticos son otra de las estrategias que han ganado notoriedad en los últimos años, pero hasta el momento no hay evidencia del impacto de los probióticos en la descolonización y se debe tener precaución con esta aproximación, ya que la

manipulación del microbioma podría tener consecuencias no deseadas y los microorganismos utilizados para la producción del probiótico también podrían causar infecciones, especialmente en individuos inmunodeprimidos y en enfermos críticos (408,412–414).

Otra de las estrategias de descolonización es el trasplante de microbiota fecal (TMF) (5,415–418). Esta estrategia terapéutica se ha establecido como una terapia segura y eficaz para los pacientes con *Clostridium difficile* recurrente y está recomendada por las directrices internacionales (419,420). Aunque el TMF parece ser una estrategia exitosa, se necesitan pruebas más sólidas de su eficacia, seguridad, procedimientos y el establecimiento de un consenso, ya que todavía se sabe poco del efecto de la manipulación del microbioma. Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos (***Food and Drug Administration; FDA***) emitió una alerta de seguridad en junio de 2019 en la que se informaba de dos casos de adultos inmunodeprimidos que desarrollaron infecciones invasivas causadas por *E. coli* productor de BLEE después de recibir un TFM (421). La FDA exige ahora el cribado de los donantes para detectar la presencia de microorganismos MDR. Ante las importantes preguntas sin respuesta sobre la interacción entre el microbioma y su hospedador, el TMF debe tomarse con cautela y esperar a tener datos más sólidos sobre su eficacia y el impacto a largo plazo. Además, hay otras variables que es necesario armonizar como la vía de administración, el método de conservación de las heces, el donante ideal de heces, la preparación del receptor del TMF o el número de TMF a realizar, entre otros (408,422–424).

Teniendo en cuenta todas las cuestiones que todavía están sin resolver en las distintas estrategias, por el momento, no existen regímenes de descolonización universalmente aceptados para las enterobacterias MDR. Basándose en el nivel de

evidencia actual, las directrices de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; ESCMID) publicadas en 2019 no recomiendan la descolonización rutinaria de los portadores de enterobacterias portadoras de BLEEs o carbapenemasas (408,425). Por lo tanto, existe una clara necesidad de más evidencia científica, de evaluaciones más rigurosas de las estrategias existentes y de descubrir nuevas estrategias antes de implementarlas en la práctica clínica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

La presente Tesis Doctoral se centró en el estudio de distintos aspectos relacionados con la resistencia y la virulencia del clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST15, así como en la mejora de su identificación y erradicación. Los títulos de los cuatro capítulos que conforman este trabajo, así como los objetivos de cada capítulo, son los siguientes:

Capítulo I. Secuenciación del genoma de dos cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 aisladas durante un gran brote en España.

- Objetivo 1. Secuenciar el genoma de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 aisladas durante un brote hospitalario.
- Objetivo 2. Analizar la secuencia completa de los genomas de las cepas aisladas durante el brote para conocer su composición y estructura.

Capítulo II. Kpi, un sistema chperona-*usher* pili asociado al clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15 ampliamente diseminado por todo el mundo.

- Objetivo 3. Estudiar las características fenotípicas de la cepa *Klebsiella pneumoniae* Kp3380 productora de OXA-48.
- Objetivo 4. Identificar los genes implicados en el fenotipo adherente mostrado por *K. pneumoniae* Kp3380 mediante un análisis genómico comparativo.
- Objetivo 5. Evaluar el papel del sistema chaperona-*usher* pili Kpi en el fenotipo adherente mostrado por *K. pneumoniae* Kp3380 *in vitro* e *in vivo*.
- Objetivo 6. Analizar la prevalencia del sistema chaperona-*usher* pili Kpi en *K. pneumoniae*.

Capítulo III. Rasgos genómicos que promueven la diseminación y la persistencia del clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15 productor de OXA-48 en España.

- Objetivo 7. Caracterizar el brote ocurrido en el Hospital Universitario de A Coruña entre 2013 y 2018.
- Objetivo 8. Secuenciar el genoma de los distintos STs de *Klebsiella pneumoniae* productora de OXA-48 implicados en el brote ocurrido en el Hospital Universitario de A Coruña.
- Objetivo 9. Identificar las características genómicas específicas del clon epidémico *K. pneumoniae* ST-15 mediante un análisis genómico comparativo.
- Objetivo 10. Estudiar la implicación del sistema de dos componentes FhaB/FhaC en el fenotipo adherente mostrado por *K. pneumoniae* Kp3380.
- Objetivo 11. Desarrollar una técnica rápida de detección del clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15.

Capítulo IV. Actividad antiadhesiva de un extracto polifenólico de *Vaccinium corymbosum* dirigido a la colonización intestinal causada por *Klebsiella pneumoniae*.

- Objetivo 12. Obtener y caracterizar un extracto salino de *Vaccinium corymbosum* con alto contenido en polifenoles.
- Objetivo 13. Evaluar el efecto antiadherente del extracto de *Vaccinium corymbosum* en modelos de infección y/o colonización por *Klebsiella pneumoniae* Kp3380 *in vitro* e *in vivo*.

-

-

CAPÍTULOS

CAPÍTULOS.

CAPÍTULO I. Secuenciación del genoma de dos cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 aisladas durante un gran brote en España.

Resumen.

Klebsiella pneumoniae ha adquirido recientemente notoriedad como patógeno debido al aumento del número de infecciones graves y a la escasez de tratamientos eficaces. Es importante destacar que coloniza fácilmente el tracto gastrointestinal siendo capaz de entrar en otros tejidos y causar infecciones graves en los seres humanos.

En el año 2013 se inició en el Hospital Universitario de A Coruña un brote producido por *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos que afectó a más de 500 pacientes. Con el objetivo de estudiar las características genómicas de esta cepa epidémica, se obtuvo el ADN genómico de dos aislamientos obtenidos del mismo paciente en un periodo de 6 meses. El segundo aislamiento, denominado Kp3380, mostró una menor sensibilidad a la colistina en comparación con el primer aislamiento, denominado Kp1803, que fue sensible a este antibiótico aunque ambas cepas mostraron un fenotipo multirresistente. En este estudio, secuenciamos el genoma de ambos aislamientos utilizando el secuenciador GS Junior (Roche) siguiendo los protocolos estándar de secuenciación 454.

El aislamiento Kp1803 se secuenció dos veces y las lecturas resultantes se combinaron en el mismo ensamblaje. Un 98,95% de las lecturas procedentes de la primera secuenciación y un 98,61% de las lecturas de la segunda fueron ensambladas mostrando un número total de 107 contigs, siendo 102 de ellos contigs grandes (>500

pb) con longitudes que oscilan entre 349.019 pb y 643 pb. Teniendo en cuenta estos contigs grandes, su tamaño medio fue de 54.965 pb y el N50 fue de 124.193 pb. El tamaño estimado del genoma completo fue de 6,6 Mb con un contenido de G+C del 57,2% y un total de 5.331 secuencias codificantes de proteínas. La secuencia de los *contigs* obtenidos fue depositada en GenBank bajo el número de acceso PITN00000000.

En el caso del aislamiento Kp3380, el 99,40% de las lecturas se ensamblaron obteniendo un total de 169 contigs, siendo 159 de ellos contigs grandes (>500 pb) con longitudes que oscilan entre 288.531 pb y 613 pb. Teniendo en cuenta estos contigs grandes, su tamaño medio fue de 35.128 pb y el N50 fue de 69.019 pb. El tamaño estimado del genoma completo fue de 6,1 Mb con un contenido de G+C del 57,2% y un total de 5.381 secuencias codificantes de proteínas. La secuencia de los *contigs* obtenidos fue depositada en GenBank bajo el número de acceso PITM00000000.



Draft Genome Sequences of Two Epidemic OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Isolated during a Large Outbreak in Spain

E. Gato,^a L. Álvarez-Fraga,^a J. A. Vallejo,^a S. Rumbo-Feal,^a M. Martínez-Gutián,^a A. Beceiro,^a M. Poza,^a G. Bou,^a A. Pérez^a

^aDepartamento de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC), Hospital Universitario A Coruña (HUAC), Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña, Spain

ABSTRACT We report here the draft genome sequences of *Klebsiella pneumoniae* strains Kp1803 and Kp3380 isolated during a large outbreak at A Coruña Hospital in Spain. The final genome assemblies for Kp1803 and Kp3380 comprise approximately 6.6 and 6.1 Mb, respectively, and both strains have G+C contents of 57.2%.

The emergence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains makes it difficult to treat and prevent infections (1, 2) caused by this microorganism. An increasing prevalence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains has been reported worldwide (3–7). A Coruña Hospital experienced an outbreak of infections caused by carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains that affected more than 500 patients. These strains showed a remarkable capacity to colonize the gastrointestinal tract of patients, which acts as a reservoir for transmission and makes controlling the spread of infection difficult.

Two strains, Kp1803 and Kp3380, were isolated from the same patient with urinary tract infection in a period of 6 months. The second isolate, Kp3380, showed a reduced susceptibility to colistin compared to the first isolate, Kp1803. Here, we report the genome sequences of these two *K. pneumoniae* strains, which may help us to gain insight into outbreak progression despite the early implementation of infection-control procedures.

Genomic DNA was isolated using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega) following the manufacturer's protocols. Genome sequencing was performed using the GS Junior sequencer (454 Life Sequencing, Inc.), and the whole-genome shotgun fragment libraries were constructed from 500 ng of genomic DNA using a rapid library preparation kit. The GS Junior Titanium emulsion PCR Lib-L kit was used for the amplification of the shotgun libraries. The GS Junior Titanium sequencing system, combined with GS Junior Titanium PicoTiterPlate kits, was used to determine the nucleotide sequence of the amplified DNA libraries. Standard 454 pyrosequencing protocols were followed. Reads were assembled into contigs using the 454 gsAssembler software program with default parameters. Contigs were reordered onto the *K. pneumoniae* ATCC 43816 KPPR1 (GenBank accession number CP009208) and *K. pneumoniae* PMK1 (GenBank accession number CP008929) reference genomes using the contig-ordering tool of the Java-based graphical-interface program MAUVE (version 2.3). Genome annotations were performed using the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server. Strain Kp1803 was sequenced twice, and the resulting libraries were combined in the same assembly. A total of 151,948 reads (68,432,817 bp), with an average length of 450.37 bp, were generated in the first sequencing, and 122,612 reads (50,334,328 bp), with an average length of 410.52 bp, were generated in the second; 98.95% and 98.61% of the reads coming from the first and second sequencings, respectively, were assembled, resulting in a total of 107 contigs, 102 of them being

Received 26 January 2018 Accepted 9 March 2018 Published 29 March 2018

Citation Gato E, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Martínez-Gutián M, Beceiro A, Poza M, Bou G, Pérez A. 2018. Draft genome sequences of two epidemic OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated during a large outbreak in Spain. *Genome Announc* 6:e00026-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00026-18>.

Copyright © 2018 Gato et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to G. Bou, german.bou.avevalo@sergas.es, or A. Pérez, astrid.perez.gomez@sergas.es.

large contigs with lengths ranging from 643 to 349,019 bp. The average and N_{50} sizes of these large contigs were 54,965 bp and 124,193 bp, respectively. The estimated complete genome size was 6.6 Mb with a G+C content of 57.2% and a total of 5,331 protein-coding sequences. For strain Kp3380, a total of 183,509 reads (78,976,972 bp) were generated, with an average length of 430.88 bp; 99.40% of the reads were assembled, resulting in a total of 169 contigs, 159 of them being large contigs with lengths ranging from 613 bp to 288,531 bp. The average and N_{50} sizes of these large contigs were 35,128 bp and 69,019 bp, respectively. The estimated genome size was 6.1 Mb with a G+C content of 57.2% and a total of 5,381 protein-coding sequences.

Accession number(s). The whole-genome shotgun sequencing projects reported here have been deposited at GenBank under the accession numbers [PITN00000000](#) for strain Kp1803 and [PITM00000000](#) for strain Kp3380.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology to A.P. and by projects PI11/01034 and P14/00059 to M.P., integrated in the National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation 2013–2016 and funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), General Subdirección of Assessment and Promotion of the Research-European Regional Development Fund (FEDER) “A Way of Making Europe.” We also thank the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0014 to G.B.), cofinanced by the European Development Regional Fund (EDRF) and by the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad.

REFERENCES

1. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18:413–431. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>.
2. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. 2014. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 20:862–872. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12697>.
3. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina JM, Perez-Vazquez M, Aracil B, Campos J. 2013. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 57:6344–6347. <https://doi.org/10.1128/AAC.01513-13>.
4. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, Perez-Vazquez M, Fernandez-Garcia MD, Delgado-Iribarren A, Sanchez-Romero I, Garcia-Picazo L, Miguel MD, Solis S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. 2013. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 68:317–321. <https://doi.org/10.1093/jac/dks383>.
5. Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, Fernandez-Romero N, Garcia-Rodriguez J, Perez-Blanco V, Moreno-Ramos F, Mingorance J. 2013. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother* 68:89–96. <https://doi.org/10.1093/jac/dks364>.
6. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4398–4401. <https://doi.org/10.1128/AAC.00329-11>.
7. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>.

CAPÍTULO II. Kpi, un sistema chperona-usher pili asociado al clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15 ampliamente diseminado por todo el mundo.

Resumen.

El aumento de la prevalencia del patógeno *Klebsiella pneumoniae*, en particular de las cepas resistentes a los antibióticos carbapenémicos, se considera una grave amenaza para la salud pública. El éxito de este patógeno se ve favorecido por su capacidad de adquirir genes de resistencia a los antimicrobianos, de propagarse y de persistir tanto en el medio ambiente como en los seres humanos. Se ha detectado a nivel global un incremento en la incidencia de infecciones causadas por cepas multirresistentes pertenecientes a clones de alto riesgo como son el STs 11, 15, 101 y 258. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que promueven su diseminación. Por lo tanto, conocer los factores que intervienen en la patogenicidad y la epidemicidad de *K. pneumoniae* es importante para el manejo de las infecciones causadas por este patógeno y el desarrollo de tratamientos eficaces alternativos.

Entre 2013 y 2018 detectamos un brote producido por *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos carbapenémicos en el Hospital Universitario de A Coruña. Afectó a 682 pacientes, de los cuáles, 462 presentaban colonización intestinal. Se seleccionó un aislamiento denominado Kp3380 con el objetivo de estudiar las características fenotípicas y genotípicas de esta cepa epidémica. Encontramos que esta cepa destacaba por mostrar un fenotipo altamente adherente al realizar un estudio fenotípico comparativo con otras cepas de *K. pneumoniae* aislados en infecciones esporádicas o brotes nosocomiales en diferentes hospitales de España. El fenotipo adherente mostrado por Kp3380 estaba relacionado con la presencia de abundantes estructuras tipo pilus en su superficie.

La secuenciación del genoma nos permitió identificar un nuevo sistema chaperona-*usher* pili en la cepa Kp3380, al que denominamos Kpi. Este sistema está codificado por un operón policistrónico formado por 7 genes, *kpiA-G*. Un análisis filogenético reveló que Kpi pertenece al clado fimbrial tipo $\gamma 2$, el cuál se ha sido poco caracterizado hasta el momento. En este trabajo demostramos que el sistema Kpi contribuye positivamente a la capacidad de *K. pneumoniae* para formar *biofilm* y adherirse a células eucariotas de intestino, vejiga y pulmón. Además, observamos que la capacidad de colonización intestinal *in vivo* de un mutante defectivo del gen *kpiD* se vió significativamente reducida, al igual que su capacidad de infectar *Galleria mellonella*.

Finalmente, el análisis de 1649 genomas de *K. pneumoniae* aisladas de 32 países europeos mostró que el sistema Kpi está estrechamente ligado al clon de alto riesgo ST15.

Los hallazgos obtenidos en este estudio proporcionan información novedosa sobre la patogenicidad y la epidemicidad de *K. pneumoniae* portadora del sistema Kpi. La presencia de este sistema en el clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST15 podría explicar el éxito de este clon como patógeno.



Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15

Eva Gato^{a,1}, Juan Carlos Vázquez-Ucha^{a,1}, Soraya Rumbo-Feal^{a,1}, Laura Álvarez-Fraga^a, Juan A. Vallejo^a, Marta Martínez-Gutián^a, Alejandro Beceiro^a, Jose Ramos Vivas^b, Pedro J. Sola Campoy^c, María Pérez-Vázquez^c, Jesus Oteo Iglesias^c, Bruno Kotska Rodiño-Janeiro^{a,d}, Antonio Romero^e, Margarita Poza^a, Germán Bou^{a,2}, and Astrid Pérez^{a,2}

^aDepartamento de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Instituto de Investigación Biomédica A Coruña, Universidad de A Coruña 15006 A Coruña, Spain; ^bLaboratorio de Microbiología, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla, 39011 Santander, Spain; ^cLaboratorio de Referencia en Resistencia a Antibióticos, Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, 28222 Madrid, Spain; ^dDepartment of Civil and Environmental Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139; and ^eCentro de Investigaciones Biológicas, 28040 Madrid, Spain

Edited by Scott J. Hultgren, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, and approved June 12, 2020 (received for review December 5, 2019)

Control of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* continues to be challenging. The success of this pathogen is favored by its ability to acquire antimicrobial resistance and to spread and persist in both the environment and in humans. The emergence of clinically important clones, such as sequence types 11, 15, 101, and 258, has been reported worldwide. However, the mechanisms promoting the dissemination of such high-risk clones are unknown. Unraveling the factors that play a role in the pathobiology and epidemicity of *K. pneumoniae* is therefore important for managing infections. To address this issue, we studied a carbapenem-resistant ST-15 *K. pneumoniae* isolate (Kp3380) that displayed a remarkable adherent phenotype with abundant pilus-like structures. Genome sequencing enabled us to identify a chaperone-usher pili system (Kpi) in Kp3380. Analysis of a large *K. pneumoniae* population from 32 European countries showed that the Kpi system is associated with the ST-15 clone. Phylogenetic analysis of the operon revealed that Kpi belongs to the little-characterized γ_2 -fimbrial clade. We demonstrate that Kpi contributes positively to the ability of *K. pneumoniae* to form biofilms and adhere to different host tissues. Moreover, the in vivo intestinal colonizing capacity of the Kpi-defective mutant was significantly reduced, as was its ability to infect *Galleria mellonella*. The findings provide information about the pathobiology and epidemicity of Kpi⁺ *K. pneumoniae* and indicate that the presence of Kpi may explain the success of the ST-15 clone. Disrupting bacterial adherence to the intestinal surface could potentially target gastrointestinal colonization.

Klebsiella pneumoniae | GI tract colonization | ST-15 high-risk clone | pathogenesis | chaperone-usher pili system

The global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is a major threat in healthcare settings as these bacteria cause infections associated with high mortality, primarily due to delays in the administration of appropriate empirical therapy and the limited treatment options available (1–3). In this era of antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae* is a particularly dangerous multidrug-resistant (MDR) pathogen as it rapidly acquires resistance to all known antibiotics, especially carbapenems (last-line class of antibiotics), and it is thus becoming more and more difficult to treat (4). Moreover, *K. pneumoniae* is the most common carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and one of the most common pathogens causing nosocomial infections. Examination of genomic and epidemiological data from 1,649 *K. pneumoniae* isolates collected from 244 hospitals in 32 countries across Europe, showed that harboring a carbapenemase is the main cause of carbapenem resistance in diverse phylogenetic backgrounds (5). However, the majority of carbapenemase-positive *K. pneumoniae* isolates belong to only four clonal lineages: Sequence

types (STs) 11, 15, 101, 258/512, and their derivatives (5). Antimicrobial resistance and pathogenic efficacy are likely to be key factors in the success of these worldwide-disseminated high-risk *K. pneumoniae* clones.

The high incidence of *K. pneumoniae* infections is promoted by the ability of this pathogen to colonize the gastrointestinal (GI) tract, which is linked to subsequent infection (6, 7). GI colonization thus represents an important reservoir of strains involved in nosocomial infections (8) and which can potentially cause outbreaks. In this context, the successful fight against carbapenem-resistant *K. pneumoniae* infections should not only focus on antimicrobial resistance but also on the virulence

Significance

Emergence of the pathogen *Klebsiella pneumoniae* (particularly of carbapenem-resistant strains) is considered a dire threat to public health. Resistance and virulence determinants may favor the emergence of untreatable infections. Understanding the mechanisms involved in the pathogenesis and epidemicity of *K. pneumoniae* is essential for managing outbreaks and developing treatments. Here we identify a CUP system (Kpi) and infer the epidemiology of Kpi⁺ *K. pneumoniae* in Europe. We demonstrate a direct link between Kpi presence and *K. pneumoniae* persistence in the hospital environment. Adherence of the bacterium to different cell types enables host colonization, favoring nosocomial outbreaks and spread of infection. Kpi appears to play a key role in the host–pathogen interaction and is associated with the worldwide-disseminated ST-15 clone.

Author contributions: A.P. designed research; E.G., J.C.V.-U., S.R.-F., L.Á.-F., J.A.V., M.M.-G., J.R.V., P.J.S.C., M.P.-V., B.K.R.-J., A.R., and A.P. performed research; A.P. contributed new reagents/analytic tools; E.G., J.C.V.-U., S.R.-F., L.Á.-F., J.A.V., M.M.-G., A.B., J.R.V., P.J.S.C., M.P.-V., J.O.I., B.K.R.-J., A.R., M.P., G.B., and A.P. analyzed data; A.P. wrote the paper; E.G., J.C.V.-U., and S.R.-F. wrote, conducted review, and edited; and A.B., J.O.I., M.P., and G.B. advised in the experiments and writing.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This open access article is distributed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 \(CC BY-NC-ND\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Data deposition: The transmission electron microscopy and confocal laser-scanning microscopy images are openly available in Zenodo at <https://zenodo.org/record/3806241#.Xuy4v2hKhk4>.

¹E.G., J.C.V.-U., and S.R.-F. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: german.bou.arevalo@sergas.es or astrid.perez.gomez@sergas.es.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1921393117/-DCSupplemental>.

First published July 8, 2020.

factors that mediate the infectivity of the species. In addition to the advances in the application of carbapenemase inhibitors to treat these infections (9), monoclonal antibodies that act on *K. pneumoniae* are also being developed and are showing promise as new therapeutic approaches or strategies (10, 11). In this respect, preclinical studies have demonstrated that the antibody KP3, which binds the type 3 fimbrial subunit, MrkA, may contribute to providing protection against MDR *K. pneumoniae* (10–12). Targeting adherence-related virulence factors is a promising strategy as these factors may determine the capacity of a colonizing strain to cause infection. *K. pneumoniae* expresses several fimbrial surface structures in order to adhere to abiotic and biotic surfaces. Chaperrone-usher pili (CUP) systems are the most abundant adhesive structures in *K. pneumoniae* and consist of one usher, at least one chaperone, and at least one fimbrial subunit. As CUP operons may have different numbers of chaperones and fimbrial subunits (13), they are classified on the basis of the usher protein into α -, β -, γ -, κ -, π -, and σ -fimbrial clades. Moreover, the γ -fimbrial clade is divided into γ_1 -, γ_2 -, γ_3 -, and γ_4 -fimbriae on the basis of specific operon features (14).

Up to nine different CUP systems have been identified in a single strain, apparently conferring the capacity to attach to different surfaces (15, 16). Almost all *K. pneumoniae* isolates possess both classic types of CUP systems: Type 1 (*fim*) and type 3 (*mrk*) pili. Type 1 pili play a role in bacterial adherence to human mucosal or epithelial surfaces; although type 3 pili also attach to cell surfaces, they are considered important enhancers of biofilm formation (17). Type 1 pili are key pathogenic factors in *K. pneumoniae* urinary tract infections (UTIs); however, their involvement in intestinal colonization or lung infection is unclear. It has recently been reported that deletion of the *fim* operon in an uropathogenic *Escherichia coli* strain leads to significant defects in colonization (18). However, intestinal colonization and lung infection caused by *K. pneumoniae* are not affected by either type 1 or type 3 pili (19, 20). In this study, we identified a CUP system in an epidemic carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strain. We demonstrate that this pilus system is involved in biofilm formation and adherence, as well as in the intestinal colonizing capacity of the pathogen. The system may therefore be considered a key pathogenic factor promoting the dissemination of *K. pneumoniae*. Analysis of a large and epidemiologically diverse *K. pneumoniae* population revealed that all ST-15 isolates share the same Kpi operon identified in the outbreak-related Kp3380 strain. Thus, the presence of Kpi may explain the success of the ST-15 clone.

Results

Clinical Impact of a Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* Strain. At A Coruña University Hospital from 2013 to 2018, patients with positive CRE clinical samples were routinely screened for intestinal colonization of CRE for infection control purposes and according to local guidelines. During the 6-y-long study, 5,340 *K. pneumoniae* nonduplicate isolates were detected in clinical and colonization samples in the Microbiology Department. Approximately a 13% (682 of 5,340) of these isolates were positive for OXA-48 carbapenemase, thereby dramatically increasing the prevalence of carbapenem-resistant isolates. Genotyping showed that most of the isolates belonged to an ST-15 clone, which was initially isolated from 15 patients in 2013 and spread rapidly, causing a large outbreak despite the implementation of strict control measures. We tested intestinal colonization in 462 of 682 patients infected or colonized with the OXA-48-producing *K. pneumoniae* strain. A 93.3% of them were positive for this epidemic clone. To understand the success of the ST-15 clone, we conducted an in-depth characterization of the associated virulence functions.

The Epidemic Clone Kp3380 Is Highly Adherent. The Kp3380 isolate was used as a representative clone of the above-mentioned outbreak. We used eukaryotic epithelial cells (HT-29 colorectal cells, HT-1376 bladder cells, and A549 alveolar cells) to analyze the adherence phenotype of the clinical strains Kp3380, Kp09107, Kp924, Kp727, Kp1278, along with the reference strains MGH78578 and ATCC10031, which represent different host cells targeted by *K. pneumoniae*. The data collected (Fig. 1A) revealed that Kp3380 and MGH78578 had a higher capacity for adherence than the other strains tested ($P < 0.0001$). Similarly, strain Kp3380 demonstrated a hyperbiofilm-producing phenotype, reaching an OD_{580/600} ratio of ~ 4.5 (as assessed by Crystal violet staining), which is significantly different ($P < 0.0001$) from that of most of the strains assayed (i.e., OD_{580/600} ratio between 0.4 and 1.3) (Fig. 2A). We wondered whether the differences in adherence shown by these strains could be explained by bacterial surface structures used in cell adhesion processes. To address this question, we cultured strains under the same conditions used to infect the human epithelial cells and examined the cells by transmission electron microscopy (TEM). Microscopic observation of the surface appendages produced by these strains revealed quantitative and qualitative differences between the strains analyzed (Fig. 1B). We observed a relationship between the presence of abundant pilus-like structures on the bacterial surface and a highly adherent phenotype.

Characterization of a CUP System in Kp3380. Protein coding genes involved in adherence were analyzed relative to the fully sequenced, annotated genome of clinical isolate Kp3380 (21). Comparative genome analysis enabled us to identify a region of $\sim 6,500$ bp containing seven genes, which are thought to be involved in adherence. In silico analysis of the genomic region revealed that it may code for a polycistronic operon. RT-PCR analysis of total RNA demonstrated that genes CWR42_04160 to CWR42_04190 are cotranscribed as a single operon. Inter-genic fragments amplified from cDNA match those observed when genomic DNA was used as a template (SI Appendix, Fig. S1). The operon, named here *kpiABCDEF*G, consists of one usher gene (*kpiG*), three molecular chaperone genes (*kpiB*, *kpiE*, and *kpiF*), and three fimbrial genes (*kpiA*, *kpiC*, and *kpiD*) (Fig. 3A). The function of each gene was predicted on the basis of amino acid homologies with other fimbrial proteins. The protein structure of each gene product was predicted using the RaptorX server. Each protein belonging to the Kpi pilus system was used as a query to search for related protein structures included in the Protein Database. The results are summarized in SI Appendix, Table S1. Protein structure modeling revealed that the Kpi pilus system is structurally related to CUP system type 1 (SI Appendix, Table S1). However, the phylogenetic analysis based on the usher (KpiG) amino acid sequence comparisons (SI Appendix, Table S2) showed that Kpi is included in the phylogenetic clade γ_2 (Fig. 3B).

A more detailed functional analysis of each protein of the Kpi system was conducted using the InterPro and HHpred servers. Three conserved usher domains were identified in KpiG: PF00577 (amino acids 203 to 767), PFAM13954 (amino acids 37 to 182), and PFAM13953 (amino acids 776 to 842) (Fig. 3A). HHpred analysis revealed that all fimbrial proteins contain the conserved domains COG3539 and PFAM00419. However, the domain PFAM00419 was only found in KpiC and KpiD (amino acids 54 to 205 and 38 to 191, respectively) when using InterPro server (Fig. 3A). All three chaperones (KpiB, KpiE, and KpiF) were found to contain two conserved chaperone domains: PFAM00345 (amino acids 24 to 154, 4 to 172, and 3 to 163, respectively) and PFAM02753 (amino acids 176 to 235, 194 to 253, and 186 to 243, respectively) (Fig. 3A). Comparative functional and sequencing analysis of the proteins of the Kpi and the γ_2 -fimbriae Fas (14)

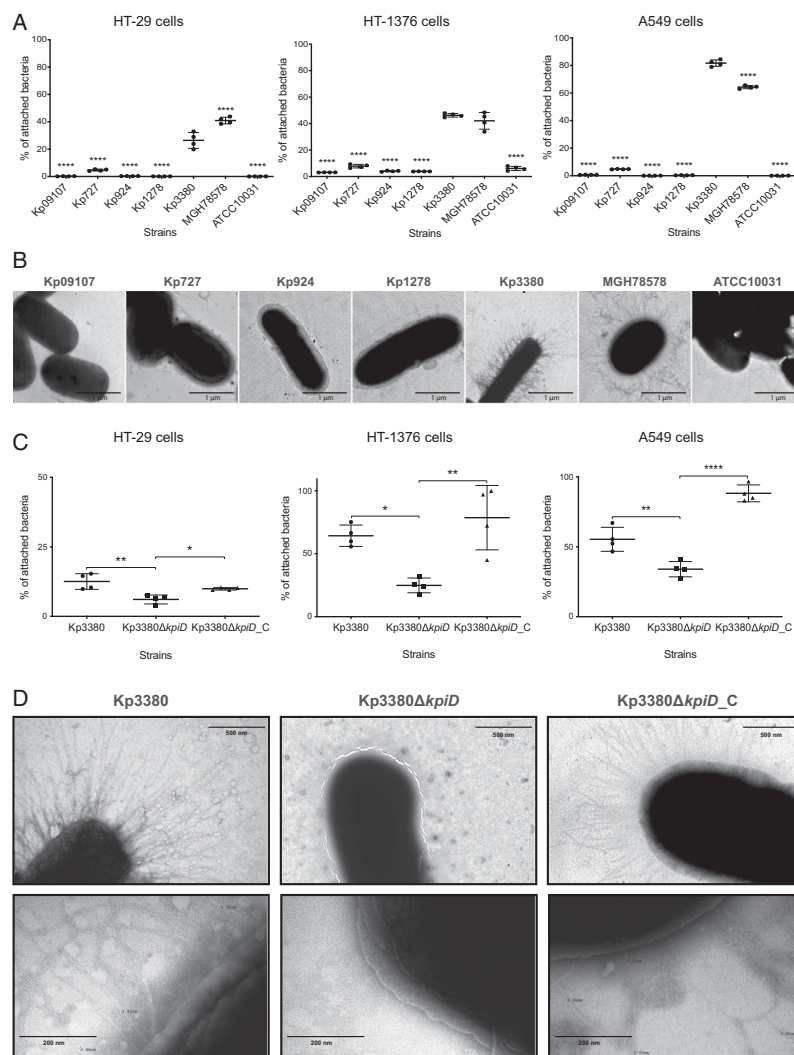


Fig. 1. Adherence phenotype and TEM images of *K. pneumoniae*. (A and C) Quantification of the adherence of *K. pneumoniae* strains to HT-29 intestinal colorectal cells, HT-1376 bladder cells, and A549 alveolar cells. Bacterial adherence is reported as the percentage of attached bacteria relative to the number of bacteria used to infect the eukaryotic cells (assumed to be 100%). The data represent four independent biological replicates. ANOVA was applied to the data to indicate significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control (Kp3380 in A and Kp3380ΔkpiD in C). Statistical significance is indicated (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and **** $P \leq 0.0001$). Values shown are means, and error bars indicate SDs. (B and D) TEM images of *K. pneumoniae* strains. Micrographs were taken at 30,000× (B), 60,000× (D, Upper), and 250,000× (D, Lower) magnification. Bars indicate the scale.

revealed that KpiD might be the major fimbrial subunit as it shares the highest sequence identity (21.76% identity and 96% coverage) with FasA. All three chaperones of the Kpi system (KpiB, KpiE, and

KpiF) only share sequence identity with FasB (22.41% identity and 98% coverage, 24.12% identity and 85% coverage, 21.63% identity, and 91% coverage, respectively).

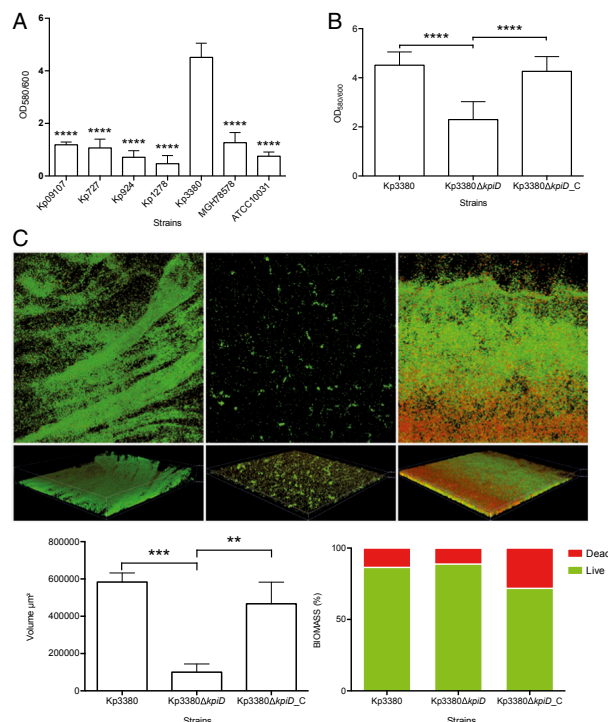


Fig. 2. Analysis of biofilm formation of *K. pneumoniae* isolates. (A and B) Quantification of biofilm formation by Crystal violet staining. Six independent biological replicates were analyzed. ANOVA was applied to the data to indicate significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control (Kp3380 in A and Kp3380ΔkpiD in B and C). Statistical significance is indicated (** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, and **** $P < 0.0001$). The values shown are means, and error bars indicate SDs. (C) CLSM images of *K. pneumoniae* Kp3380, Kp3380ΔkpiD and Kp3380ΔkpiD_C isolates (Upper). Bacteria were stained using the BacLight LIVE/DEAD viability kit. Live cells fluoresce in green and dead cells fluoresce in red. Original magnification 200x. Quantification of fluorescence (live/dead) for each strain is represented Lower Left. Biofilm biomass (live/dead) is represented as a percentage Lower Right.

The Kpi Fimbriae System Is Closely Associated with the High-Risk Clone *K. pneumoniae* ST-15. We analyzed the genomes of 1,649 *K. pneumoniae* isolates collected from 32 European countries as part of the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE), in order to evaluate the distribution of the Kpi system in *K. pneumoniae*. The Kpi system was detected in 19.1% (315 of 1,649) of isolates belonging to 41 different STs. In addition, 46% (145 of 315 isolates) of Kpi⁺ *K. pneumoniae* belonged to ST-15 (Fig. 4), and all of the ST-15 isolates tested positive for the Kpi system. A total of 132 (91.1%) ST-15 isolates shared exactly the same operon with Kp3380 (100% coverage and 100% identity) (Fig. 4). Seven (4.8%) ST-15 isolates had several amino acid changes, and in six (4.1%) of the ST-15 isolates the whole operon could not be evaluated because of a gap in the genome sequence (between two different contigs) (Fig. 4). The Kpi system was also detected in 16.8% (53 of 315 isolates), 9.5% (30 of 315 isolates), and 4.7% (15 of 315 isolates) of *K. pneumoniae* isolates belonging to ST-405, ST-14, and ST-25, respectively (Fig. 4). However, the *kpiABCDEF* operon from ST-14, ST-25, and ST-405 isolates displayed several amino acid changes relative to the Kp3380 strain (Fig. 4).

Examination of the distribution of ST-15 isolates showed that this clone was involved in outbreaks occurring in Hungary, Croatia, Romania, and Spain (Fig. 4). In addition, the presence of Kpi was evaluated in all of the genomes of *K. pneumoniae* deposited in GenBank (7,950 genomes), in order to confirm that all ST-15 isolates are positive for the system. Of these genomes, 4.7% (377 of 7,950) of the isolates belonged to ST-15. In addition, 98.1% (370 of 377) of the isolates were Kpi⁺ and shared the same operon with Kp3380 (100% coverage and 98 to 100% identity). In 1.89% (7 of 377) of the ST-15 isolates, the whole operon could not be evaluated, because of a gap in the genome sequence (between two different contigs). Thus, although the percentage of ST-15 *K. pneumoniae* isolates in all of the genomes available in GenBank was lower, the results are consistent with those obtained with the EuSCAPE collection.

The Presence of the Kpi Fimbriae System Is Associated with Adherence. DNA-based multiple comparison of the operon *kpiABCDEF* in isolates Kp09107 (ST-101), Kp727 (ST-405), Kp924 (ST-11), Kp1278 (ST-15), Kp3380 (ST-15), and MGH78578

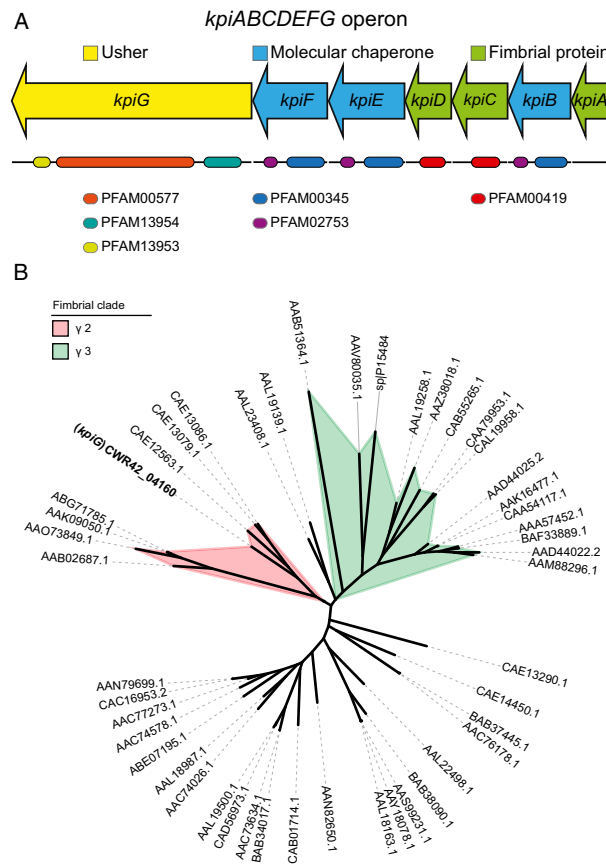


Fig. 3. Characterization of the CUP system Kpi in *K. pneumoniae*. (A) Genetic organization of the *kpiABCDEF* operon. Arrows indicate the location and direction of gene transcription, and colors indicate functions. Functional domains are pointed. (B) ML tree of the usher amino acid sequences described by Nuccio and Baumber (14) [SI Appendix, Table S2] and the usher (KpiG) sequence identified in the Kp3380 genome (GenBank accession code PITM00000000.1). Graphic representation was generated using iTOL v5.1.1.

(ST-38) revealed that only Kp3380 and MGH78578 have a complete, apparently functional operon. Analysis of the nucleotide identity of Kpi in MGH78578 revealed several amino acid changes in the operon relative to the Kp3380 strain. Although strain Kp727 has a complete operon, it has multiple stop codons in the *kpiD* gene. Strain Kp1278 only had the *kpiG* gene, which codes for the usher protein. Neither of these genes was found in strains Kp924 or Kp09107.

We also analyzed the most common adhesive appendages in *K. pneumoniae*: That is, the type 1 and type 3 fimbriae (pili), in all of the above-mentioned strains. We found that all strains have intact type 1 (*fim*) and type 3 (*mrk*) loci.

We observed a correlation between the presence of the Kpi system and a highly adherent phenotype. Interestingly, we observed a nonadherent phenotype in the Kp727 strain, which

harbors a complete operon with multiple stop codons in the *kpiD* gene. Therefore, deletion of the fimbrial protein KpiD seems to be crucial for the functional inactivation of the Kpi system.

Effect of *kpiD* Gene Deletion on Attachment to Eukaryotic Cells. Considering that the fimbrial protein KpiD plays an important role in the production of functional fimbriae in the Kp727 K. pneumoniae strain and it might be the major subunit of the Kpi system, we deleted the *kpiD* gene to investigate the role of Kpi fimbriae in bacterial functions. A *kpiD*-defective knockout strain (Kp3380Δ*kpiD*) was constructed and the parental *kpiD* gene was introduced into Kp3380Δ*kpiD* for complementation.

The interactions between Kp3380 (and derivative strains) and eukaryotic cells were also examined. For this purpose, different host cells frequently targeted by *K. pneumoniae*—including colorectal

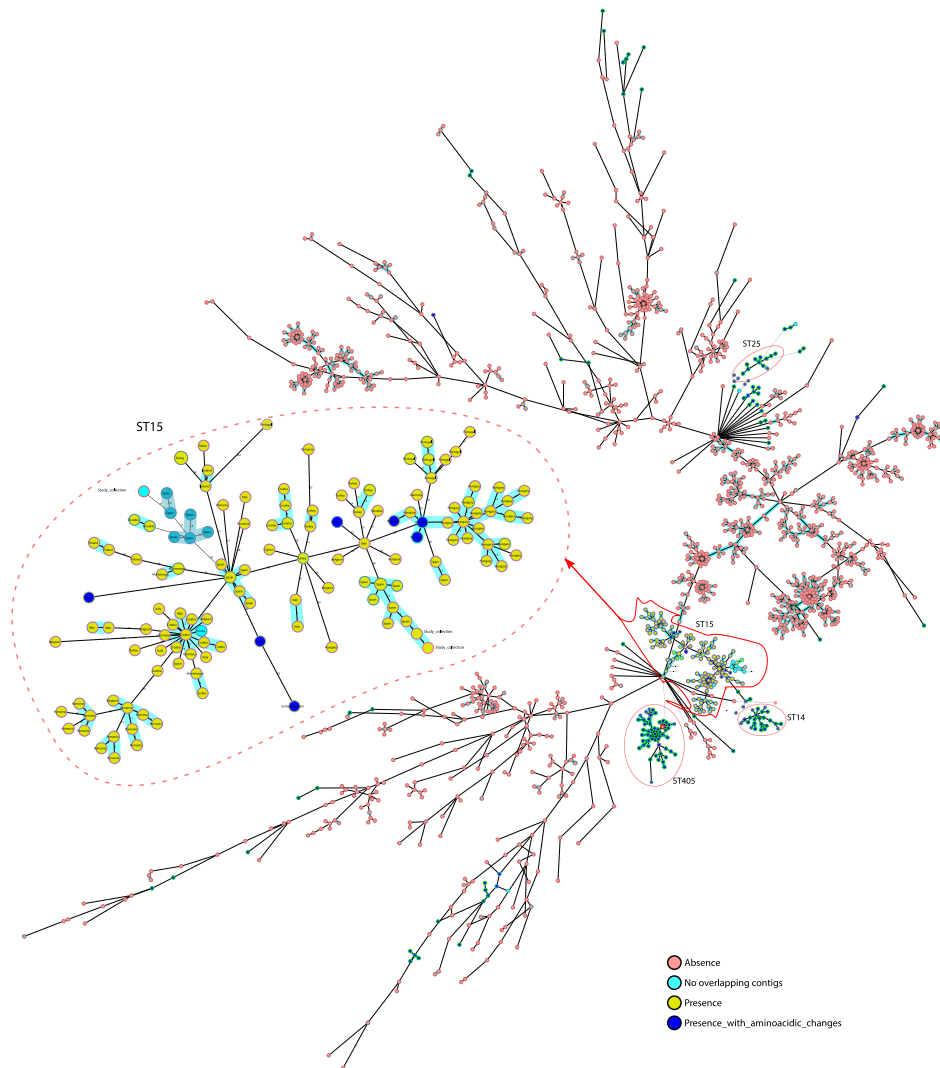


Fig. 4. International spread of Kpi⁺ *K. pneumoniae* isolates. The phylogenetic tree includes 1,649 *K. pneumoniae* isolates collected during the EuSCAPE survey. The colors of the isolates indicate absence/presence of the *kpiABCDEF* operon and whether or not the operon has amino acid changes or the sequence is incomplete. Blue shadow indicates that isolates are genetically related.

cells (HT-29), bladder cells (HT-1376), and alveolar cells (A549)—were infected with Kp3380, Kp3380Δ*kpiD*, and the complemented strain (Kp3380Δ*kpiD*_C) to determine their adherent phenotype and thus demonstrate the role of the *kpiD* gene in adherence. This approach revealed that significantly fewer Kp3380Δ*kpiD* bacteria were

recovered from infected cells than from cells infected with Kp3380 bacteria, regardless of the type of host cells tested. Absence of the *kpiD* gene reduced the number of bacteria attached to HT-29, HT-1376, and A549 eukaryotic cells by, respectively, ~50% ($P \leq 0.01$), 60% ($P \leq 0.05$), and 40% ($P \leq 0.01$) (Fig. 1C). The

parental phenotype was restored in the complemented strain (Kp3380 Δ kpiD_C) (Fig. 1C).

Considering that Kp3380 loses its highly adherent phenotype when the *kpiD* gene is deleted, we wondered whether the production of bacterial surface structures in this mutant strain would be affected. TEM images were obtained from the bacterial surface of the wild-type strain and its derivative strains, cultured under the same culture conditions used to infect the eukaryotic cells. Strain Kp3380 and the Kp3380 Δ kpiD-complemented strain produced abundant pilus-like structures around the cell surface (Fig. 1D). In contrast, TEM revealed that there were no pilus-like structures around the mutant cells (Fig. 1D).

Deletion of the *kpiD* Fimbriae Gene Reduces Biofilm Formation. Two different approaches were used to test the effect of *kpiD* deletion on biofilm formation. The Crystal violet assay revealed that inactivation of the *kpiD* gene significantly reduced biofilm production ($P \leq 0.0001$) (Fig. 2B). Complementation of the knockout strain with the parental allele (Kp3380 Δ kpiD_C) restored the wild-type phenotype (Fig. 2B). Biofilms produced by the strains of interest were also evaluated by confocal laser-scanning microscopy (CLSM) and digital imaging. Fig. 2C shows biomass measurements as well as representative 3D renderings of the biofilms. Quantification using reconstructions of confocal sections revealed minimal differences between live and dead bacteria in comparisons of biofilms formed by the wild-type strain and the knockout strain. However, the Kp3380 Δ kpiD strain formed significantly less biofilm, which was also structurally altered (Fig. 2C). Complementation of the mutant strain (Kp3380 Δ kpiD_C) restored the parental phenotype. The biofilm formed by the complemented strain showed a structure similar to that of Kp3380.

Kp3380 Δ kpiD Is Attenuated In Vivo. A *Galleria mellonella* survival assay (16 larvae per group) was used to assess the role of the *kpiD* gene in the virulence of *K. pneumoniae* Kp3380. The survival study (Fig. 5A) showed that 84% of the larvae infected with the parental strain died after 5 d of infection, while 50% of the larvae infected with the Kp3380 Δ kpiD mutant survived. The ability of the mutant strain to infect and kill *G. mellonella* was therefore significantly affected ($P = 0.0096$), relative to that of the wild-type strain. Larvae injected with sterile PBS were used as negative controls.

The parental phenotype was not successfully restored in the complemented strain, as it did not retain the complementation plasmid in the in vivo model (59% of bacteria did not harbor the plasmid at 15 h postinfection).

Role of Kpi Fimbriae System in Kp3380 Intestinal Colonization and Lung Infection. Considering the role of the Kpi fimbriae system in in vitro adherence to HT-29 colorectal cell and A549 alveolar cells, we used in vivo mice models to investigate the role the system plays in both intestinal colonization and lung infection. The in vivo colonization ability of strain Kp3380 lacking the *kpiD* gene was investigated. Mice pretreated with streptomycin (six per group) (Fig. 5B) were individually inoculated (via oral route) with either the parental strain Kp3380 (3.8×10^6 CFU in 100 μ L PBS) or the mutant strain Kp3380 Δ kpiD (4.1×10^6 CFU in 100 μ L PBS). The fecal bacterial burden 24 h after colonization was 2.33×10^7 CFU/mL for Kp3380 and 5.5×10^6 CFU/mL for Kp3380 Δ kpiD. Colonized mice were killed on day 3 after inoculation to enable determination of the intestinal bacterial burden. The levels of bacteria were significantly lower ($P = 0.0022$) in the cecum and colon of mice colonized with the mutant strain than in the corresponding organs of mice colonized with the wild-type strain (Fig. 5B). Mice orally inoculated with PBS were used as negative controls, and no bacteria were recovered from intestinal segments of these mice. The parental

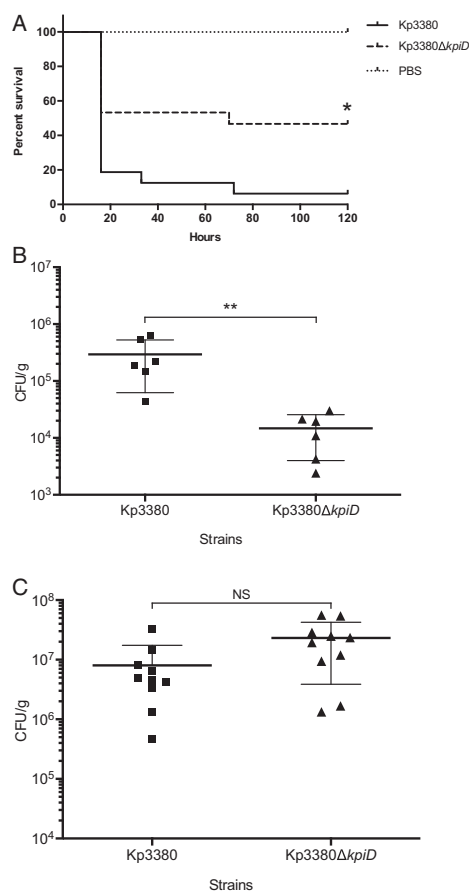


Fig. 5. Role of the *kpiD* gene in *K. pneumoniae* virulence. (A) *G. mellonella* larvae were injected with Kp3380 or Kp3380 Δ kpiD bacteria and survival was monitored for 5 d. Larvae injected with PBS were used as negative controls. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the survival distributions of two groups: the larvae infected with Kp3380 and the larvae infected with Kp3380 Δ kpiD. The statistical significance is indicated (* $P = 0.0096$). (B) Intestinal colonization of mice with the Kp3380 parental strain or the Kp3380 Δ kpiD mutant was achieved by oral gavage with $\sim 6 \times 10^6$ bacteria. The bacterial burden in intestinal segments (cecum and colon) was determined 72 h postinoculation. The Mann-Whitney test was used to determine significant differences between the two groups. The statistical significance is indicated (** $P = 0.0022$). Values are means, and bars indicate the SD. (C) Mice were intratracheally infected with $\sim 6 \times 10^6$ of the Kp3380 parental strain or the Kp3380 Δ kpiD mutant. The number of bacteria in lung homogenates was determined 24 h postinfection. The Mann-Whitney test was used to determine significant differences between the groups. Not statistically significant differences were observed (NS). Values are means, and bars indicate the SDs.

phenotype was not successfully restored in the complemented strain, as it did not retain the complementation plasmid in the in vivo model (45% of bacteria did not harbor the plasmid on day 3 after inoculation).

Similarly, mice were intratracheally infected with the Kp3380 and its *kpiD*-defective mutant to assess the in vivo virulence of this strain in a lung infection model. At 24 h postinfection the mice infected with Kp3380Δ*kpiD* had a similar lung burden as the mice infected with the parental strain (Fig. 5C).

Discussion

The severity, prevalence, and morbidity of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* infections manifest the urgent need for new strategies to manage and treat these serious infections. A large number of MDR and extensively drug-resistant *K. pneumoniae* strains belonging to specific clonal groups that have emerged and have become globally disseminated show an enhanced capacity to cause outbreaks worldwide. Clonal group 15, consisting of ST-14 and ST-15, is one of the most significant outbreak-causing clonal groups. Understanding the epidemic traits of these highly disseminated successful clones is essential to enable identification of specific targets for developing preventive measures and treatment (4). Antimicrobial resistance and virulence are the main factors favoring the successful emergence of these high-risk clones.

A number of virulence factors have been demonstrated to promote *K. pneumoniae* infectivity (17). In this study, we used an outbreak-related ST-15 *K. pneumoniae* isolate to identify potential pathogenic targets in *K. pneumoniae*. Phenotypic analysis revealed that this strain has a more adherent phenotype than other strains belonging to different STs from outbreaks in other hospitals in Spain. Electron microscopy data revealed a relationship between the presence of abundant pili on the surface of Kp3380 and its adherent phenotype.

Comparative genome analysis enabled us to identify a CUP system (Kpi) in Kp3380, which was absent or functionally affected in the other strains tested. Thus, we hypothesized that the adherent phenotype observed in Kp3380 may be determined by expression of this system. Proteins encoded by the *kpiABCDEF* operon were found to have a *fim*-like structure, with the exception of KpiA, which is not structurally related to any crystallized protein. However, the Kpi system does not share the same gene organization. Unlike the Fim system, Kpi belongs to the largely unexplored γ_2 fimbrial clade. Like the Kpi system, operons belonging to γ_2 -fimbriae have three chaperone genes (14) and share similar gene organization. Comparative functional and sequencing analysis of Kpi and the best-studied member of the γ_2 -fimbriae [i.e., Fas in *E. coli* (14)] revealed that these systems share common characteristics. The fimbrial protein KpiD is possibly the major subunit. KpiA share the functional annotation characteristics with FasG; therefore, we hypothesized that this protein could be the tip adhesin. However, KpiA is shorter than FasG and is not structurally related to any crystallized protein, which pointed out that additional analyses are required to elucidate the function of this protein. Unlike the Fas system, all three chaperones of the Kpi system contain the two chaperone domains: PFAM00345 and PFAM02753. Although Kpi is phylogenetically related to the Fas system, it is phylogenetically more closely related to the uncharacterized member plu0268 from *Photobacterium luminescens* (14).

Several CUP systems, including the type 1 and type 3 fimbriae (pili) (15–17), have been reported to be involved in adherence in *K. pneumoniae*, and we therefore wondered whether the ability of Kp3380 to form biofilms and to attach to eukaryotic cells was due to the presence of the Kpi system.

Although the Kpi pilus system is structurally related to the type 1 pilus system, it plays a role in the interaction of Kp3380 with both abiotic and biotic surfaces. Like their Fim (7) and Kpg

(15) counterparts, Kpi is needed for adherence to epithelial surfaces. However, unlike Fim fimbriae, the Kpi system has been demonstrated to be required for the attachment of Kp3380 to different types of epithelial cells, such as HT-29 intestinal cells, A549 alveolar cells, and HT-1376 bladder cells. Similarly, the ability of the Kp3380 strain to form biofilms has been shown to be impaired when the fimbrial protein KpiD was deleted. A number of CUP systems have been reported to play a role in biofilm formation, highlighting the role of type 3 (*mrk*) pili as a strong biofilm promoter (22–26). Type 1 (*fim*) pili, along with type 3 (*mrk*) pili, are involved in biofilm formation on urethral tract catheters (23–27). Up to eight usher-type pili have been identified in the LM21 *K. pneumoniae* strain, among which Kpa, Kpg, and Mrk also play a role in biofilm formation (15). Similarly, Kpc fimbriae have been shown to increase biofilm formation activity in the *K. pneumoniae* NTUH-K2044 strain (16).

In view of the fact that Kpi is involved in adherence to colorectal cells, and that the first step in most infections caused by *K. pneumoniae* is colonization of the patient's GI tract, we used an in vivo animal model to investigate the role of the fimbriae in intestinal colonization. The Fas system is involved in adherence to piglet intestinal cells in *E. coli* (14). Other adhesive structures have been reported to confer binding to intestinal cells in *K. pneumoniae*, suggesting that they play a role in GI tract colonization (28–30). However, the role of type 1 and type 3 fimbriae in intestinal colonization remains controversial. It has been reported that neither type of pilus affects the ability of *K. pneumoniae* to colonize or infect the lungs (20, 27, 31). In contrast to previous reports, it has been claimed that murine intestinal colonization is impaired in both *mrk*-defective LM21 and *fim*-defective LM21 strains (15). It has recently been reported that down-regulation of type 1 fimbriae in *K. pneumoniae* NTUH-K2044, together with the lack of type VI secretion systems, is important for bacterial intestinal colonization (32).

We have demonstrated here that the colonizing capacity of the KpiD-defective Kp3380 strain was significantly reduced, indicating that the fimbriae are required for GI tract colonization. However, we did not observe attenuation of the virulence of the Kp3380Δ*kpiD* mutant strain in an acute murine pneumonia infection model. The observed differences in these two in vivo models may be due to the different host environment. Bacteria use distinct strategies when interacting with hosts, and the molecular mechanisms used by *K. pneumoniae* to colonize the GI tract or to cause acute infections, such as pneumonia, may differ widely. Adherence-related virulence factors (such as Kpi) in *K. pneumoniae* may play a crucial role in colonization while other virulence factors may have a more important role in acute infection models. As colonization with *K. pneumoniae* is closely associated with subsequent infection, our findings may be important for understanding the underlying mechanisms of disease progression. Kpi⁺ *K. pneumoniae* may have an advantage that enables them to persist in humans and in the hospital environment, thus favoring progression of the outbreak, despite intensive intervention protocols. Indeed, we found that this CUP system is closely associated with clonal group 15, which includes widely disseminated high-risk clones of *K. pneumoniae* causing outbreaks worldwide (4). Therefore, the Kpi system may at least partly explain the superior capacity of these clones to spread and cause outbreaks and may represent a specific target for controlling the emergence of these successful high-risk clones.

Finally, as the ability of the mutant strain to infect and kill *G. mellonella* was significantly affected, along with its role in adherence and biofilm formation, we suggest that Kpi plays a role in the virulence of *K. pneumoniae* Kp3380.

It is worth pointing out that, contrary to what we found in the in vitro assays, plasmid-based complementation of the Kpi system did not restore wild-type function in the in vivo models, despite roughly half of the bacteria harboring the complementation plasmid.

A possible explanation for this might be that the plasmid-carrying bacteria are outcompeted by plasmid-free bacteria, due to the fitness cost associated with plasmid expression (33, 34), particularly under the growth-limiting conditions found in the host environment. This fact, along with the observed loss of complementation plasmid, might be decisive in the plasmid-bearing bacteria being unable to develop the infection properly, leading to the complementation failure.

In summary, we identified a CUP system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *K. pneumoniae* ST-15. Our findings provide evidence that this system positively contributes to *K. pneumoniae* adherence, biofilm formation, and virulence in specific models. The information acquired regarding the pathobiology and epidemiology of Kpi⁺ *K. pneumoniae* indicates that the Kpi system could be targeted in order to interrupt host pathogen-interactions that promote dissemination of the *K. pneumoniae* ST-15 clone.

Materials and Methods

Screening of Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. Infection prevention and control interventions in our hospital include screening of CRE colonized patients when a positive clinical sample for CRE is detected (35). First, intestinal colonization (rectal swabs) is analyzed for patients infected with CRE (clinical sample positive for CRE). Then, screening of patients admitted to the same room, as well as those patients admitted to the same department, are also included in the screening, according to the infection control protocols of our hospital. Patients from whom CRE have been isolated from a clinical sample are placed in strict contact isolation until two consecutive rectal swabs are negative for CRE. These patients are then discharged from contact isolation measures. None of the authors has had any contact with patients. The samples were handled under strict confidentiality criteria without any possibility of relating a bacterial isolate to any patient.

Multilocus Sequence Typing Analysis. Multilocus sequence typing (MLST) was performed using seven housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*) as previously described (36). Sequences of amplified genes were used to obtain the MLST profile using the *K. pneumoniae* MLST database (<https://bigdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Bacterial Strains, Plasmids, and Culture Conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in *SI Appendix, Table S3*. Strain Kp3380 was selected from a collection of 682 *K. pneumoniae* outbreak-related isolates obtained between February 2013 and October 2018. Isolates were selected on the basis of reduced susceptibility to ertapenem. All isolates were positive for OXA-48 carbapenemase, as determined by the Xpert Carba-R test run on a Genexpert platform (Cepheid). Strains were grown in Luria Bertani (LB) broth (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl) or on LB agar (LB broth supplemented with 20 g/L of agar). Hygromycin and apramycin were used to select transformant strains at concentrations of 200 µg/mL and 150 µg/mL, respectively. Gentamicin and kanamycin were used at a concentration of 50 µg/mL. The strains were routinely grown at 37 °C with shaking and stored at –80 °C in LB broth with 10% glycerol.

RNA Extraction and RT-PCR. To demonstrate the polycistronic nature of the operon, the cDNA was obtained from RNA samples with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's recommendations. RNA was obtained using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche). RNA samples were treated with DNase I and purified with RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen). The cDNA was amplified with GoTaq.

For DNA polymerase (Promega), pairs of primers were designed to be complementary to the 3' end of every gene and the 5' end of the next one. Genomic DNA was used as a template for the positive control and total RNA was used as a template for the negative control of the amplification. The primers and probes used are listed in *SI Appendix, Table S4*.

Bioinformatics Analysis. Rapid Annotation with Subsystem Technology (RAST) (<https://rast.nmpdr.org/>) was used for comparative analysis of *K. pneumoniae* genomes. Functional annotation of proteins of the CUP system KpiABCDEFG was assessed using InterPro and HHPred (37, 38). Protein structure modeling of the CUP system KpiABCDEFG in *K. pneumoniae* was predicted using RaptorX (RaptorX: Protein Structure and Function Prediction Powered by Deep Learning, raptorx.uchicago.edu).

Phylogenetic Analyses. Phylogenetic analysis based on the usher amino acid sequence was used to classify the *kpiABCDEFG* fimbrial operon. A set of reference proteins (*SI Appendix, Table S2*) was used to establish the γ_1 , γ_2 , and γ_3 groups (14).

A hidden Markov model (HMM) was built using the seed alignment of the PF00577 family from Pfam (usher family), with hmmbuild in the HMMER v3.0 package (39). The usher sequence set (KpiG) and the proteins listed in *SI Appendix, Table S2* were aligned against the HMM by using hmalign in the HMMER v3.0 package, with the outformat phyllip option (39). The resulting alignment was used in the phylogenetic analysis. Maximum-likelihood (ML) phylogeny was constructed using RAxML v8.0 (40) and the LG model of amino acid substitution rates with empirical amino acid frequencies and the γ -model of rate heterogeneity (–m PROTGAMMALGF option). A rapid Bootstrap analysis and search for the best scoring ML tree was performed (–f a option) with 1,000 repetitions (the random number seed for the parsimony inferences was –p 12345 and for rapid bootstrapping, –x 12345). The best tree graphic representation was generated using iTOL v5.1.1 (41).

BLASTn (42) was used to evaluate the presence/absence of the CUP system in *K. pneumoniae* strains. The sequence of the CUP system was used as a query against all of the *K. pneumoniae* sequences available in the National Center for Biotechnology Information database (in October 2019) and against 1,649 *K. pneumoniae* strains isolated in 32 European countries. The presence and absence of the *kpiABCDEFG* sequence were identified using megablast and filtered considering a coverage of between 34% and 100% and an identity of between 99.51% and 100%.

A core-genome MLST (cg-MLST) was performed to describe the distribution of the CUP system in a large population of *K. pneumoniae*. The cg-MLST relies on species-specific schemes with a fixed number of chromosomal target genes. Thus, 2,538 targets provided by SeqSphere+3.5.0 (Ridom) were used to compare *K. pneumoniae* isolates from this study with *K. pneumoniae* strains described in the EuSCAPE project (5), and data on the presence/absence of the CUP system were included to examine its distribution.

Construction of the Knockout Strain. The *kpiD* gene was deleted from Kp3380 by a previously described method (43). Briefly, the pU773 plasmid was used as a template to amplify the apramycin resistance cassette flanked by FRT sites with primers that included 5' extensions with homology for the *kpiD* gene (*SI Appendix, Table S4*). For chromosomal gene replacement, the PCR product was electroporated into Kp3380 previously transformed with the plasmid pACBSR-Hyg, which expresses the λ -Red system and a hygromycin selection marker. Bacteria were incubated overnight on LB Agar supplemented with apramycin, and correct insertion of the apramycin cassette was confirmed by PCR. The Kp3380 derivative strain was grown on LB agar with apramycin (150 µg/mL), at 37 °C for 3 d, and then incubated on LB agar with apramycin (150 µg/mL) and LB agar with hygromycin (200 µg/mL), overnight at 37 °C, to test for loss of the helper plasmid. For removal of resistance markers, cells were transformed with pFLP-Hyg and grown overnight at 30 °C. The mutants were then incubated at 43 °C in order to remove the apramycin resistance cassette. Apramycin-susceptible mutants were selected to confirm the *kpiD* gene deletion by PCR and sequencing. The level of expression of each gene in the *kpiABCDEFG* operon was determined. Results confirmed that only the *kpiD* gene expression was null in the Kp3380Δ*kpiD* strain. The primers used in this procedure are listed in *SI Appendix, Table S4*.

Complementation of the Mutant Derivative Kp3380Δ*kpiD* Strain. The fimbrial gene *kpiD* was PCR-amplified with specific oligonucleotides (*SI Appendix, Table S4*) from the Kp3380 strain. The amplified DNA was purified, digested with SmaI and SacI (Thermo Fisher Scientific), and then ligated (T4 DNA ligase, Thermo Fisher Scientific) into a similarly digested expression pUCP24 vector under control of the tetracycline gene promoter. The tetracycline gene promoter was first amplified from the pWH1266 plasmid, digested with BamHI and SmaI endonucleases (Thermo Fisher Scientific) and then cloned into the pUCP24 vector. The construct was checked by PCR analysis with specific primers (*SI Appendix, Table S4*). The derivative pUCP24/*kpiD* plasmid was incorporated into the Kp3380Δ*kpiD* mutant strain by electroporation for complementation studies. Transformant strains were selected on agar plates with gentamicin (50 µg/mL).

Bacterial Adhesion to Human Epithelial Cells. Adhesion abilities of the *K. pneumoniae* strains were determined following the previously described procedure (44, 45), with some modifications. Three cell lines were used in this experiment, including A549 human alveolar epithelial cells, HT-29 human colorectal epithelial cells, and HT-1376 human urinary bladder epithelial cells. The A549 cells were grown in the presence of 5% CO₂ at 37 °C, on DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS

(Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (P/S, Gibco). McCoy's 5A Medium 1x (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1% P/S, and 1% Glutamax (Gibco) and Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 1% P/S, 1% Glutamax, and 1% MEM nonessential amino acid Solution (Sigma-Aldrich) were used to grow HT-29 and HT-1376, respectively. Cells were washed, trypsinized, and transferred to 24-well plates (Corning Costar TC-Treated Multiple Well Plates) to produce a monolayer of $\sim 10^5$ cells per well. After incubation for 24 h at 37 °C, confluent monolayers were washed twice with saline solution and once with modified HBSS (mHBSS, HBSS without glucose). For preparation of inoculum, 100 mL of fresh LB Broth in a 250-mL glass Erlenmeyer flask was inoculated with 1 mL of the overnight culture and then grown at 37 °C with shaking at 180 rpm until the culture reaches OD₆₀₀ of 0.1. Bacteria cells were pelleted by centrifugation (4,000 × g, 15 min), washed twice with PBS, and resuspended in mHBSS (1:10 dilution). The cells were then infected with 10⁵ bacteria per well and incubated for 3 h in mHBSS at 37 °C. The infected monolayers were washed three times with saline solution and lysed in 500 µL of 0.5% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich). Dilutions of the lysates were plated onto LB agar and incubated at 37 °C for 24 h. In order to determine the percentage of bacteria that attached to A549, HT-29 or HT-1376 cells, colony-forming units (CFU) were counted 24 h later. The percentage of attached bacteria was compared with the total number of infecting bacteria. Four independent biological replicates were analyzed. ANOVA was used to indicate significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control. Kp3380 was used as control group when analyzing data from panel A. Kp3380Δ*kpiD* was used as a control group when analyzing data from panel C.

Quantitative Biofilm Assay. Biofilm formation was quantified following a previously described procedure (46), with some modifications. *K. pneumoniae* strains were grown on LB broth overnight at 37 °C with shaking. Overnight cultures were diluted 1:100 and inoculated in 48-well flat bottom polystyrene microtiter plates (Corning Costar TC-Treated Multiple Well Plates). Samples were incubated at 37 °C for 24 h under static conditions, and biofilm formation was visualized by staining with 0.1% Crystal violet. Bacterial growth was measured at OD₆₀₀ to estimate total cell biomass. Biofilm formation was quantified (OD₅₄₀) after being solubilized with 30% acetic acid. The amount of biofilm formed was determined from the OD₅₄₀/OD₆₀₀ ratio, to compensate for variations due to differences in bacterial growth. Six independent biological replicates were analyzed. ANOVA was used to indicate significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control. Kp3380 was used as the control group when analyzing data from panel A. Kp3380Δ*kpiD* was used as the control group when analyzing data from panel B.

TEM. Bacterial cells were grown under the same conditions used to infect epithelial cells. Freshly prepared carbon-coated, nitrocellulose substrate TEM grids were placed substrate side down, directly on top of the drop containing the bacterial suspension and allowed to sit covered for 5 min. Grids were removed and negatively stained with 5 mL of 1.5% (wt/vol) ammonium molybdate for 5 min. The grids were then blotted with filter paper and allowed to dry. Images were captured at 120 kv with a JEOL JEM-2010. Images of three grids (100 mesh) were obtained for each strain. Representative images of bacterial cells were taken after evaluation of the whole grid. Experiments were performed in duplicate for each strain.

CLSM. Biofilm architecture related to the selected strains was studied in four-well microslides (Ibidi) as previously described (47). Briefly, the slides were placed in an inclined position (~45°) in an incubator to form a liquid-air interface and after incubation for 24 h at 37 °C, unfixed planktonic cells were removed by rinsing with saline (0.85% NaCl). The bacterial viability within biofilms was determined using the BacLight LIVE/DEAD bacterial viability kit (Molecular Probes). A series of optical sections was obtained with a Nikon A1R confocal microscope; the excitation wavelengths were 488 nm (green) and 561 nm (red), and 500- to 550-nm and 570- to 620-nm emission filters, respectively, were used. Images were captured at random at the liquid-air interface with a 20x Plan Apo (numerical aperture [NA], 0.75) objective. Reconstructions of confocal sections and quantitative measurements were performed using NIS-Elements software, v3.2. Four independent biological replicates were analyzed. ANOVA was used to indicate significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control (Kp3380Δ*kpiD*).

G. mellonella Virulence Assay. The virulence of Kp3380 strain and its derivative strains (Kp3380Δ*kpiD* and Kp3380Δ*kpiD*_C) was evaluated using a *G. mellonella* survival assay conducted according to the previously described protocol (33). Briefly, *G. mellonella* larvae were injected with 10 µL of a suspension containing $\sim 2 \times 10^2$ CFU/larva in groups of 16 larvae. For preparation of inoculum, 100 mL of fresh LB Broth in a 250-mL glass Erlenmeyer flask was inoculated with 1 mL of the overnight culture and then grown at 37 °C with shaking at 180 rpm until the culture reaches OD₆₀₀ of 0.7. Bacteria cells were pelleted by centrifugation (4,000 × g, 15 min), washed twice, and resuspended in PBS (1:1,000 dilution). One group was infected with the wild-type strain Kp3380 and the two other groups were infected with the Kp3380Δ*kpiD* and Kp3380Δ*kpiD*_C strains. Larvae injected with an equivalent volume of sterile PBS were used as controls. The infected and control larvae were incubated at 37 °C in darkness, and death was monitored at 8-h intervals during 5 d. The resulting survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method. The presence of the complementation plasmid in the complemented strain Kp3380Δ*kpiD*_C was tested at 15 h postinfection by PCR. The log-rank (Mantel–Cox) test was used to compare the survival distributions of two groups: The larvae infected with Kp3380 and the larvae infected with Kp3380Δ*kpiD*.

In Vivo Murine Models. The role of the Kpi pilus system in intestinal colonization and lung infection was assessed using two experimental mouse models.

The intestinal colonization capacity of the *K. pneumoniae* strains was assessed using a previously described murine colonization model (18), with some modifications. Six-week-old female BALB/c mice were randomly distributed in cages with one mouse per cage. The mice were previously treated with a single dose of streptomycin (1 g/kg in 100 µL water by oral gavage), to clear the GI tract of colonizing bacteria, and then they were individually colonized with Kp3380, Kp3380Δ*kpiD*, or Kp3380Δ*kpiD*_C ($\sim 4 \times 10^6$ CFU in 100 µL PBS). For preparation of inoculum 100 mL of fresh LB Broth in a 250-mL glass Erlenmeyer flask was inoculated with 1 mL of the overnight culture and then grown at 37 °C with shaking at 180 rpm until the culture reached OD₆₀₀ of 0.7. Bacteria cells were pelleted by centrifugation (4,000 × g, 15 min), washed twice, and resuspended in PBS. After 24 h, 0.3 g of fecal sample was collected and the bacterial burden was determined in order to confirm intestinal colonization with the strains of interest. Three days after inoculation, the mice were killed and intestinal segments (cecum and colon) were processed under aseptic conditions. Intestinal segments were weighed before homogenization and plated on LB supplemented with kanamycin at 50 mg/mL to determine the bacterial burden. The presence of the complementation plasmid in the complemented strain Kp3380Δ*kpiD*_C was tested on day 3 after inoculation by PCR.

The pneumonia model procedure was previously described (33). Briefly, mice anesthetized with an oral suspension of sevoflurane (Zoetis, #NADA 141–103) were intratracheally inoculated via the oral cavity with an endoscope. A 40-µL bacterial suspension (2×10^7 CFU per mouse) prepared (as described above) in sterile saline solution and 10% porcine mucin (wt/vol; Sigma) mixed at a 1:1 ratio was used to establish pneumonia. Mice that died in the first 4 h postinfection were not analyzed further. The mice were killed 20 h after infection and processed under aseptic conditions. The lung tissue was plated on LB agar to determine the bacterial burden. The Mann–Whitney test was applied to the data to determine any significant between-group differences.

All mice were maintained in the specific pathogen-free facility at the Technology Training Centre of the A Coruña University Hospital Complex (Spain).

Ethics. Animal experiments were carried out with the approval of and in accordance with regulatory guidelines and standards established by the Animal Ethics Committee of the A Coruña University Hospital Complex (project code P82). This committee follows the recommendations of the National Committee for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animal Research.

Data Availability. The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and/or its supplementary materials. TEM and CLSM images are openly available in Zenodo at <https://zenodo.org/record/3806241#Xuy4v2hKhk4>.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors thank Dr Fidel Madrazo for help with transmission electron microscopy and confocal laser-scanning microscopy assays. This research was supported by Projects p-01216A and IJCI-2016-29524 (to A.P.), funded by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), respectively. It was also supported by Projects PI11/01034 (to

M.P.), P114/00059 and P117/1482 (to M.P. and A.B.), and P118/00501 (to G.B.), included in the National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation 2013-2016 and funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/006) cofinanced by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" and operative program Intelligent Growth 2014-2020. Grant BFU2016-77835-R of the

MINECO (to A.R.) also supported this research. E.G. was financially supported by the SEIMC project. J.C.V.-U. was financially supported by the PFI5 (Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en Salud) program (F18/00315); J.A.V. was financially supported by IN607A.2016/22; M.M.-G. was financially supported by a Clara Roy grant (SEIMC); A.B. was financially supported by the Miguel Servet program (ISCIII, Spain); B.K.R.-J. was financially supported by Marie S. Curie Action SaPhaDe project (MSCA-IF-GF-836754); and A.P. was financially supported by the Juan de la Cierva program (MINECO, UCI-2016-29524).

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), *Rapid Risk Assessment: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae-8 April 2016*, (ECDC, Stockholm, 2016).
- WHO, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (WHO Media Center, 2017). <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed 31 October 2019.
- T. Frieden, *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*, (Centers for Disease Control and Prevention, 2013), Vol. 114.
- S. Navon-Venezia, K. Kondratyeva, A. Carattoli, *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 252–275 (2017).
- S. David et al., EuSCAPE Working Group; ESGEM Study Group, Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat. Microbiol.* **4**, 1919–1929 (2019).
- R. M. Martin et al., Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *MSphere* **1**, e00261-16 (2016).
- R. M. Martin, M. A. Bachman, Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 4 (2018).
- C. L. Gorrie et al., Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 208–215 (2017).
- D. P. Calfee, Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. *F1000 Res.* **6**, 1760 (2017).
- Q. Wang et al., Target-agnostic identification of functional monoclonal antibodies against *Klebsiella pneumoniae* multimeric mrkA fimbrial subunit. *J. Infect. Dis.* **213**, 1800–1808 (2016).
- Q. Wang et al., Anti-MrkA monoclonal antibodies reveal distinct structural and antigenic features of MrkA. *PLoS One* **12**, e0170529 (2017).
- S. W. Dickey, G. Y. C. Cheung, M. Otto, Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 457–471 (2017).
- A. Busch, G. Waksman, Chaperone-usher pathways: Diversity and pilus assembly mechanism. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 1112–1122 (2012).
- S.-P. Nuccio, A. J. Bäumer, Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: Fimbrial classification goes Greek. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 551–575 (2007).
- F. Khater et al., In silico analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS One* **10**, e0116215 (2015).
- C. C. Wu, Y. J. Huang, C. P. Fung, H. L. Peng, Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase Kpcl. *Microbiology* **156**, 1983–1992 (2010).
- M. K. Paczosa, J. Mecsas, *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 629–661 (2016).
- C. N. Spaulding et al., Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. *Nature* **546**, 528–532 (2017).
- C. Struve, M. Bojer, K. A. Krogfelt, Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect. Immun.* **77**, 5016–5024 (2009).
- C. Struve, M. Bojer, K. A. Krogfelt, Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect. Immun.* **76**, 4055–4065 (2008).
- E. Gato et al., Draft genome sequences of two epidemic OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated during a large outbreak in Spain. *Genome Announc.* **6**, e00026-18 (2018).
- C. N. Murphy, S. Clegg, *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: Nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* **7**, 991–1002 (2012).
- S. G. Stahlhut, C. Struve, K. A. Krogfelt, A. Reisner, Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 350–359 (2012).
- J. J. Wilksch et al., MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog.* **7**, e1002204 (2011).
- J. G. Johnson, C. N. Murphy, J. Sippy, T. J. Johnson, S. Clegg, Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **193**, 3453–3460 (2011).
- C. Schroll, K. B. Barken, K. A. Krogfelt, C. Struve, Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* **10**, 179 (2010).
- D. A. Rosen et al., Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect. Immun.* **76**, 3346–3356 (2008).
- P. Di Martino, V. Livrelli, D. Sirot, B. Joly, A. Darfeuille-Michaud, A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* **64**, 2266–2273 (1996).
- S. Favre-Bonte, A. Darfeuille-Michaud, C. Forestier, Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect. Immun.* **63**, 1318–1328 (1995).
- A. Darfeuille-Michaud et al., R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect. Immun.* **60**, 44–55 (1992).
- B. Li, Y. Zhao, C. Liu, Z. Chen, D. Zhou, Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* **9**, 1071–1081 (2014).
- P. F. Hsieh, Y. R. Lu, T. L. Lin, L. Y. Lai, J. T. Wang, *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system contributes to bacterial competition, cell invasion, type-1 fimbriae expression, and in vivo colonization. *J. Infect. Dis.* **219**, 637–647 (2019).
- L. Álvarez-Fraga et al., Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the feaA gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence* **9**, 496–509 (2018).
- A. Porse et al., Genome dynamics of *Escherichia coli* during antibiotic treatment: Transfer, loss, and persistence of genetic elements in situ of the infant gut. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 126 (2017).
- J. Oteo, G. Bou, F. Chaves, A. Oliver, Microbiological methods for surveillance of carrier status of multiresistant bacteria. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **35**, 667–675 (2017).
- L. Diancourt, V. Passet, J. Verhoef, P. A. D. Grimont, S. Brisse, Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4178–4182 (2005).
- L. Zimmermann et al., A completely reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* **430**, 2237–2243 (2018).
- P. Jones et al., InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**, 1236–1240 (2014).
- J. Mistry, R. D. Finn, S. R. Eddy, A. Bateman, M. Punta, Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Res.* **41**, e121 (2013).
- A. Stamatakis, RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
- I. Letunic, P. Bork, Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **47**, W256–W259 (2019).
- S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
- T. W. Huang et al., Capsule deletion via a λ -Red knock-out system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Res. Notes* **7**, 13 (2014).
- S. Rumbo-Feal et al., Contribution of the A. *baumannii* A15_0114 gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 108 (2017).
- L. Álvarez-Fraga et al., Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence* **7**, 443–455 (2016).
- A. P. Tomaras, C. W. Dorsey, R. E. Edelman, L. A. Actis, Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149**, 3473–3484 (2003).
- S. Remuzgo-Martínez et al., Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 3306–3315 (2015).



Supplementary Information for

Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15.

Eva Gato, Juan Carlos Vázquez-Ucha, Soraya Rumbo-Feal, Laura Álvarez-Fraga, Juan A. Vallejo, Marta Martínez-Gutián, Alejandro Beceiro, José Ramos-Vivas, Pedro J. Sola Campoy, María Pérez-Vázquez, Jesús Oteo Iglesias, Bruno Kotska Rodiño-Janeiro, Antonio Romero, Margarita Poza, Germán Bou, Astrid Pérez.
Astrid Pérez Gómez
Email: astrid.perez.gomez@sergas.es

This PDF file includes:

Figures S1
Tables S1 to S4
SI References

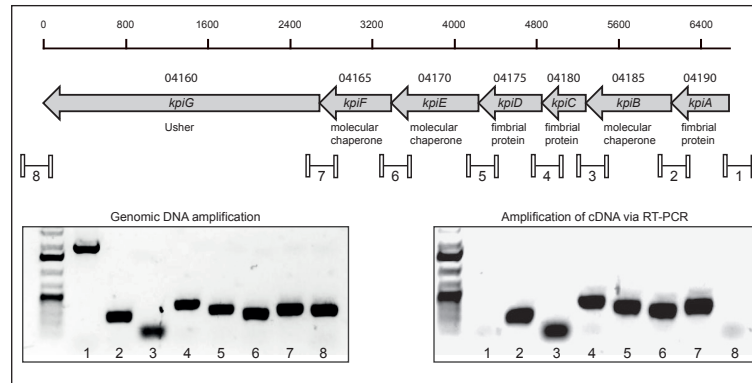
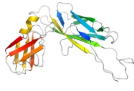
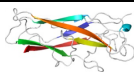
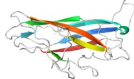
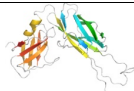
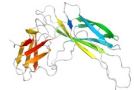



Fig. S1. Genetic organization of the *kpiABCDEFG* operon. Arrows indicate the location and direction of gene transcription. The numbers above the arrows represent the genes located within this operon. The connected open rectangles below the arrows indicate the regions amplified in PCR and RT-PCR assays using genomic DNA and DNA-free total RNA, respectively. Agarose gel electrophoresis revealed the results of genomic DNA amplification (left) and cDNA amplification by RT-PCR (right). The intergenic regions between genes within the operon are shown in lanes 2, 3, 4, 5, 6 and 7. Intergenic regions between the upstream gene and *kpiA* gene and between the downstream gene and *kpiG* are shown in lines 1 and 8, respectively

Table S1. Protein structure modeling of the CUP system *kpiABCDEFGG* in *K. pneumoniae* using RaptorX.

Operon Components	Ranking	Score [#]	% Sequence Identity ^{##}	PDB code	Description	Model
KpiA (Fimbriae) ^{###}	---	---	---	No structure	---	---
KpiB (Chaperone)	1	150/243	24	5ghu	Fimbrial chaperone YadV from <i>E. coli</i>	
	2	160/243	24	4djm	Fimbrial chaperone DraB from <i>E. coli</i>	
	3	161/243	23	2co6	Type 1 chaperone from <i>Salmonella enterica</i>	
KpiC (Fimbriae)	1	128/163	16	5lp9	Type 1 pilus subunit FimA from <i>Shigella flexneri</i>	
	2	119/163	20	6erj	Type 1 pilus subunit FimA from <i>Salmonella paratyphi</i>	
	3	104/163	14	2jty	Type 1 pilus main subunit from <i>E. coli</i>	
KpiD (Fimbriae)	1	115/179	15	5lp9	Type 1 pilus subunit FimA from <i>Shigella flexneri</i>	
	2	104/179	15	6erj	Type 1 pilus subunit FimA from <i>Salmonella paratyphi</i>	
	3	110/179	14	5afo	Type 1 fimbriae adhesin LptD from <i>E. coli</i>	
KpiE (Chaperone)	1	157/264	26	3rfz	Chaperone protein FimC from <i>E. coli</i>	
	2	145/264	25	4djm	Fimbrial chaperone DraB from <i>E. coli</i>	
	3	150/264	24	2co6	Type 1 chaperone from <i>Salmonella enterica</i>	
KpiF (Chaperone)	1	155/242	25	5ghu	Fimbrial chaperone YadV from <i>E. coli</i>	
	2	144/242	27	4djm	Fimbrial chaperone DraB from <i>E. coli</i>	
	3	144/242	27	2co6	Type 1 chaperone from <i>Salmonella enterica</i>	
KpiG (Usher)	1	668/864	34	3rfz	Type 1, Outer membrane usher protein from <i>E. coli</i>	

Score (alignment length vs sequence length); ## number of identical residues multiplied by 100; ###KpiA was not structurally related to any crystalized protein.

Table S2. Set of usher proteins for the alignment and phylogenetic classification of KpiG.

Fimbrial clade	Usher	Usher Accession (NCBI Entrez)	Organism
γ1	AtfC	CAB01714.1	<i>Proteus mirabilis</i> HI4320
γ1	AufC	AAN82650.1	<i>Escherichia coli</i> CFT073
γ1	BcfC	AAL18987.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhimurium LT2
γ1	ECs0594	BAB34017.1	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 str. Sakai
γ1	FimD	CAD56973.1	<i>Citrobacter freundii</i> 3009
γ1	FimD	AAC77273.1	<i>Escherichia coli</i> K12
γ1	FimD	AAL19500.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhimurium LT2
γ1	FmlC	ABE07195.1	<i>Escherichia coli</i> UTI89
γ1	FocD	AAN79699.1	<i>Escherichia coli</i> CFT073
γ1	SfaF	CAC16953.2	<i>Escherichia coli</i> 536
γ1	SfmD	AAC73634.1	<i>Escherichia coli</i> K12
γ1	YcbS	AAC74026.1	<i>Escherichia coli</i> K12
γ1	YdeT	AAC74578.1	<i>Escherichia coli</i> K12
γ1#	ECs4022	BAB37445.1	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 str. Sakai
γ1#	ECs4667	BAB38090.1	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 str. Sakai
γ1#	LpfC	AAAY18078.1	<i>Escherichia coli</i> 789
γ1#	LpfC	AAL18163.1	<i>Escherichia coli</i> EH41
γ1#	LpfC	AAL22498.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhimurium LT2
γ1#	PhfD	CAE13290.1	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. laumondii TTO1
γ1#	plu2157	CAE14450.1	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. laumondii TTO1
γ1#	StgC	AAS99231.1	<i>Escherichia coli</i> X7122
γ1#	SthB	AAL23408.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhimurium LT2
γ1#	StiC	AAL19139.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhimurium LT2
γ1#	YraJ	AAC76178.1	<i>Escherichia coli</i> K12
γ2	CswD (CS12)	AAK09050.1	<i>Escherichia coli</i> 350C1
γ2	ECP_3814	ABG71785.1	<i>Escherichia coli</i> 536
γ2	FasD (987P)	AAB02687.1	<i>Escherichia coli</i> 987
γ2	FotD (CS18)	AAO73849.1	<i>Escherichia coli</i> ARG-2
γ2	plu0268	CAE12563.1	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. laumondii TTO1
γ2	plu0784	CAE13079.1	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. laumondii TTO1
γ2	plu0791	CAE13086.1	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. laumondii TTO1
γ3	AfaC-3	CAA54117.1	<i>Escherichia coli</i> A30
γ3	AfaC-7	AAD44025.2	<i>Escherichia coli</i> 262 KH 89
γ3	AfaC-8	AAD44022.2	<i>Escherichia coli</i> 239 KH 89
γ3	Agg3C	AAM88296.1	<i>Escherichia coli</i> 55989
γ3	AggC	AAA57452.1	<i>Escherichia coli</i> 17-2
γ3	Caf1A	CAB55265.1	<i>Yersinia pestis</i> CO92
γ3	CS3-2	P15484	<i>Escherichia coli</i> PB176
γ3	CssD (CS6)	AAB51364.1	<i>Escherichia coli</i> E8775
γ3	DraC	AAK16477.1	<i>Escherichia coli</i> IH11128
γ3	HdaC	BAF33889.1	<i>Escherichia coli</i> O86:H-

γ3	MyfC	CAA79953.1	<i>Yersinia enterocolitica</i>
γ3	PsaC	CAL19958.1	<i>Yersinia pestis</i> CO92
γ3	PSPPH_A0064	AAZ38018.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A
γ3	SafC	AAL19258.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhimurium LT2
γ3	SefC	AAV80035.1	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Paratyphi A ATCC 9150
<hr/>			
γ1#, γ1-Fimbriae related			

Table S3. Bacterial strains and plasmids used in the present study.

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Reference or Source
<i>K. pneumoniae</i> strains		
MGH 78578	ATCC 700721 strain showing a highly adherent phenotype	ATCC
ATCC 10031	Susceptible strain with no-adherent phenotype	ATCC
Kp09107	Clinical isolate with a no-adherent phenotype	This study
Kp727	Clinical isolate with a no-adherent phenotype	This study
Kp924	Clinical isolate with a no-adherent phenotype	This study
Kp1278	Clinical isolate with a no-adherent phenotype	This study
Kp3380	Clinical isolate with a highly adherent phenotype.	This study
Kp3380 Δ kpiD	<i>KpiD</i> -defective Kp3380 mutant strain	This study
Kp3380 Δ kpiD_C	Kp3380 Δ <i>KpiD</i> strain harboring pUC_ <i>kpiD</i>	This study
<i>E. coli</i>		
TG1	Host strain used for cloning procedures	Invitrogen
Plasmids		
pIJ773	Template vector for apramycin gene amplification	(1)
pACBSR-hyg	Plasmid (hygromycin) containing an arabinose-inducible λ -Red recombinase	(1)

pFLP-hyg	Plasmid (hygromycin) containing a heat-shock inducible FLP recombinase and a p15A replicon	(1)
pWH1266	Cloning vector (tetracycline)	ATCC
pUCP24	Cloning vector (gentamicin)	(2)
pUCP24/T	Modified pUCP24 expression vector (tetracycline promoter)	This study
pUC_ <i>kpiD</i>	pUCP24/T containing the <i>kpiD</i> gene	This study

Table S4. Oligonucleotides used in the present work.

Primer /Probe name	sequence	Use in the present study
KO_ <i>kpiD</i> _fow	ctggttgaggctcctgtcagatttcagtggatcggcc cagtattacatttcgcctgtgattccgggatccgtcgacc	Construction of Kp3380Δ <i>kpiD</i>
KO_ <i>kpiD</i> _rev	aaccacagtataaatctgcccgcagcttgcggaataca ttcatttttatcgccaattcatgtaggctggagctgcttc	Construction of Kp3380Δ <i>kpiD</i>
ConfKO_ <i>kpiD</i> _fow	ggaattgaaagtgtgacccc	Testing of <i>kpiD</i> gene deletion
ConfKO_ <i>kpiD</i> _rev	cttatcgctgcctgtgtatc	Testing of <i>kpiD</i> gene deletion
BamHI_pTET_Fw	cccgatcctactcttcttttcaatattatt	Cloning the tetracycline promoter into pUCP24 plasmid
SmaI_pTET_Rv	ggcccggggccgcaagaggcccg	Cloning the tetracycline promoter into pUCP24 plasmid
<i>kpiD</i> _cloning_Fw	atgcattacaatgaacggacccgtt	Cloning of <i>kpiD</i> gene into the pUCP24/T plasmid for complementation.
SacI_ <i>kpiD</i> _cloning_Rv	cccagctctcattcataaataaactgaagcgtc	Cloning of the <i>kpiD</i> gene into the pUCP24/T plasmid for complementation.
pUCp24_check_Fw	gcctgccttcaggctgcgcaactgtt	Testing of the plasmid construction pUCP24_ <i>kpiD</i> for complementation.

pUCp24_check_Rv	tgccacgacaggtttcccgaactgga	Testing of the plasmid pUCP24_ <i>kpiD</i> for complementation.
Kp_C5G826_Fow	cagggcccggtatccagt	Reverse transcription.
Kp_C5G825_Rev	catgctgacaccagaaaggc	Reverse transcription.
Kp_C5G825_Fow	ccactgacgctacgccgg	Reverse transcription.
Kp_C5G824_Rev	ctctggcatcatcactgctc	Reverse transcription.
Kp_C5G824_Fow	ttacattacgctcgccgatctaaggtggc	Reverse transcription.
Kp_C5G823_Rev	atgataccaacacgcaggcgagcgcca	Reverse transcription.
Kp_C5G823_Fow	caaagatgctgggtgcggg	Reverse transcription.
Kp_C5G822_Rev	tgctgacaacataaagccg	Reverse transcription.
Kp_C5G822_Fow	taatattgataagctaattgtcggtactg	Reverse transcription.
Kp_C5G821_Rev	aataaacgcgtgtctgactgagct	Reverse transcription.
Kp_C5G821_Fow	ggtaagagcatggatgtgaaaggga	Reverse transcription.
Kp_C5G820_Rev	attaccagtcgacccatatgatggc	Reverse transcription.
Kp_C5G820_Fow	aaaaaacgcgctttcaaaaatgatac	Reverse transcription.

Kp_C5G819_Rev	gaaatcccgatcaaaataatcacc	Reverse transcription.
Kp_C5G819_Fow	gtcagtgccgtgtcagtttgacat	Reverse transcription.
Kp_C5G818_Rev	ctgcagttttctgagaaacgcttcc	Reverse transcription.
Kp04160 Fow 53	gcagttgccacgttactgaa	qRT-PCR
Kp04160 Rev 53	atcacccacgatgctgcta	qRT-PCR
Kp820 Fow 141	gctcagtcagacacgcgtta	qRT-PCR
Kp820 Rev 141	acctggccgctgttattct	qRT-PCR
Kp04175 Fow 92	attttcagccacgctggt	qRT-PCR
Kp04175 Rev 92	gtaatactgggccgatccac	qRT-PCR
Kp822-823 Fow 152	ctaccgtggcgatgttacct	qRT-PCR
Kp822-823 Rev 152	gacatcttggcgtgtcg	qRT-PCR
Kp824 Fow 122	gtcggcgtaacaagttcagtc	qRT-PCR
Kp824 Rev 122	ccttcgatatcccgtagac	qRT-PCR
Kp825 Fow 102	ccgttggtttatgattaagga	qRT-PCR
Kp825 Rev 102	tcacatcaaagccacattc	qRT-PCR
PreChapFimC Fow 2	tgagcctgaaaaccatacctg	qRT-PCR
PreChapFimC Rev 2	ttgcatagccagcgtcaa	qRT-PCR

References

1. Huang TW, et al. (2014) Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Res Notes* 7:13.
2. Pérez A, et al. (2012) Effect of Transcriptional Activators SoxS, RobA, and RamA on Expression of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(12):6256–6266.

CAPÍTULO III. Rasgos genómicos que promueven la diseminación y la persistencia del clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15 productor de OXA-48 en España.

Resumen.

La rápida diseminación de los clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* portadores de genes de resistencia es una grave amenaza para la salud pública mundial. Entre 2013 y 2018 se produjo un brote en el Hospital Universitario de A Coruña donde un total de 682 pacientes fueron colonizados o infectados por *K. pneumoniae* productora de OXA-48. El mayor número de pacientes infectados o colonizados se observó en 2016, coincidiendo con un aumento significativo en la resistencia a los antibióticos carbapenémicos entre los aislamientos de *K. pneumoniae* detectados durante ese año. Además, un 93.3% de los pacientes presentaban colonización intestinal por *K. pneumoniae* portadora de OXA-48.

El análisis epidemiológico de las cepas de relacionadas con el brote reveló que el 87,5% de los aislamientos pertenecían al clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST15. Junto con el ST15 se detectó de forma minoritaria aislamientos relacionados con el brote pertenecientes al ST147, ST11, ST405 y ST-551. Para poder conocer los rasgos genómicos que permitían al clon ST15 desplazar a los demás clones minoritarios se seleccionó un aislamiento de cada uno de ellos y se obtuvo la secuencia de su genoma completo con el objetivo de realizar un análisis genómico comparativo. Este análisis reveló que el clon ST15 portaba dos sistemas de virulencia relacionados con la adherencia, el sistema Kpi y el sistema FhaB/FhaC, que estaban ausentes o inactivos en el resto de STs. Se observó que el sistema FhaB/FhaC, al igual que el sistema Kpi, estaba implicado en la capacidad de *K. pneumoniae* de formar *biofilm* y de adherirse a

células intestinales humanas. Al mismo tiempo, tanto el sistema Kpi como el sistema KpFhaB-FhaC están estrechamente relacionados con el ST15 y le confieren una mayor eficacia biológica. Por último, evaluamos el uso de los genes *fhaC* y *kpiD* para detectar de forma específica el clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST15 y diseñar así una técnica rápida de detección molecular mediante PCR múltiple. Los datos obtenidos revelan que una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97,76%.

All text: Times New Roman 12-pt. font; double-spaced and left aligned (left-justified).

Manuscript Number (if known)

Article Summary Line: Defining *Klebsiella pneumoniae* ST-15 genomic traits that might explain the clinical and epidemiological behaviour of the clone

Running Title: Genomic traits of *Klebsiella pneumoniae* ST-15

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, genomic traits, ST-15 high-risk clone, outbreak, colonization.

Title

Genomic traits promoting dissemination and persistence of the high-risk OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST-15 clone in Spain

Authors: Eva Gato¹, Bruno Kotska Rodiño-Janeiro¹, María José Gude, Ana Fernández, Astrid Pérez², Germán Bou².

¹ These first authors contributed equally to this article.

² These senior authors contributed equally to this article.

Affiliations:

Institute for Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), A Coruña, Spain (E. Gato, B.K. Rodiño-Janeiro, A. Pérez, G. Bou)

University Hospital of A Coruña (HUAC), A Coruña, Spain (E. Gato, B.K. Rodiño-Janeiro, A. Fernández, A. Pérez, G. Bou)

University Hospital Lucus Augusti (HULA), Lugo, Spain (M.J. Gude)

Abstract—word count

The rapid dissemination of high-risk *K. pneumoniae* clones and resistance genes is a serious threat to global public health. A total of 682 patients were found to be colonized or infected with OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolates in a hospital in Spain between 2013 and 2018; carbapenem resistance increased from 5% to 21%. To characterize the outbreak-related strains, we performed molecular epidemiological and antimicrobial susceptibility analysis. Genotyping showed that 87.5% of the isolates corresponded to sequence type 15. Comparative genomic analysis of the major clone and the other STs identified enabled us to determine the genomic traits only present in *K. pneumoniae* ST15. We found that two adherence-related systems, i.e. the Kpi pili system and FhaB/FhaC two-partner secretion system, which are involved in adherence to abiotic and biotic surfaces, were closely associated with this epidemic clone. In vitro competition experiments indicated that both systems play a role in fitness in this *K. pneumoniae* clone. Finally, we evaluated the use of the two ST15-related genes *fhaC* and *kpiD* to specifically detect the high-risk clone *K. pneumoniae* ST15 and thus design a rapid molecular detection method using multiplex PCR.

Text—word count (word counts are strictly enforced)

Introduction

The rapid emergence of multidrug-resistant pathogens represents one of the major medical challenges at present, as almost one million people die every year from bacterial infections that cannot be treated with antibiotics. Until recently, carbapenems were considered last line antibiotics for treating infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae*. However, the emergence and rapid spread of carbapenem-resistant clones constitute a major public health problem. (1–3). Resistance to carbapenems in this pathogen is mainly driven by expression of

carbapenemases, which are often located on plasmids and can be horizontally transferred within and between bacterial species (4). *K. pneumoniae* is a major source of antibiotic resistance worldwide because of its ability to acquire antimicrobial resistance genes and to persist in humans and the environment (4,5). Although resistance determinants are found in a broad range of *K. pneumoniae* sequence types (STs), the global spread of specific high-risk MDR clones with a strong ability to cause multicontinental outbreaks contributes to the movement of resistance genes between clones increasing the antimicrobial resistance crisis (6). Some *K. pneumoniae* STs are therefore more likely to cause outbreaks than others. These clones harbour a variety of *bla* genes, including carbapenemases and/or ESBLs (4). The vast majority of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clones are included in specific clonal lineages such as ST-11, 15, 101 and 258/512 (4,7,8). The *K. pneumoniae* ST 258 clone harbours a main carbapenemase (i.e. *bla*_{KPC}); however, ST15 usually carries the CTX-M-15 β -lactamase but also encodes all types of carbapenemases such as *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}. The genomic traits of some *K. pneumoniae*, providing them with the ability to outcompete other bacteria and cause epidemics, remain unclear. It has been suggested that successful epidemic clones may be better adapted to the human host and tolerated as colonizing pathogens (9), subsequently leading to infections. In this context, adherence-related virulence factors may be crucial for epidemic success due to their important role in the colonizing capacity of these clones. We hypothesize that the genomic traits of high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones involve a concomitant increase in virulence, transmissibility and antimicrobial resistance.

In this study, we characterized the genomic traits expressed by an OXA-48-producing *K. pneumoniae* clone involved in a large outbreak in north-western Spain. The

outbreak spread in the community and eventually resulted in an endemic situation in the hospital and long term care facilities (LTCFs).

Material and Methods

Study design and bacterial isolates.

An increase in the isolation of OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolates was observed between February 2013 and October 2018 in the University Hospital of A Coruña (A Coruña, Spain). This hospital covers a population of 553,439 inhabitants. We conducted a retrospective study including all the patients who were colonized or infected with *K. pneumoniae* isolates during this period. A case was defined as being associated with acute care hospital (ACH) if the infection or colonization was detected in the patient >48 hours after admission or if the patient had documented evidence of hospitalization within the previous 6 months. A colonized case was defined when the patient had no clinical symptoms or any other evidence of clinical infection, but had rectal swabs positive for OXA-48-producing *K. pneumoniae*. Isolates were identified and antimicrobial susceptibilities were determined using automated systems (MALDI-TOF MS [Bruker] and MicroScan WalkAway [Beckman Coulter]) according to the manufacturer's criteria. Carbapenemase producers were detected using Xpert® Carba-R Kit (Cepheid). Unique (non-duplicate) *K. pneumoniae* isolates (682) from colonized or infected patients were collected during the study. One isolate of each sequence type detected among the outbreak-related strains was selected for Whole Genome Sequencing (WGS) analysis. The group of isolates selected includes ST-405 (Kp7762), ST-11 (Kp0971), ST-551 (Kp2728), ST-147 (Kp5181) and ST-15 (Kp3380). The bacterial strains used in this study are listed in the Supplementary Appendix (Table S1).

Molecular typing

The genetic relatedness between the *K. pneumoniae* isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after total chromosomal DNA digestion with XbaI (10). A dendrogram based on Dice's coefficient was constructed using Phoretix 5.0 software (Nonlinear Dynamics Ltd, UK), in order to define the different genetic lineages. Visual Tenover criteria were also applied (11). Two or more isolates were considered clonally related when the values of the Dice coefficient were higher than 0.8. *K. pneumoniae* isolates representing the different PFGE clusters were further studied by multilocus sequence typing (MLST)-as previously described (12).

Whole-genome sequencing (WGS) and bioinformatic analysis

Whole-genome sequencing (WGS) and detection of resistance genes and virulence factors were performed on five OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolates as previously described (13,14). The bioproject accession number for strains genomes is PRJEB39112.

Comparative analysis of Kp-OXA-48 genomes was performed using RAST (<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/RapidAnnotationServer>). The ideogram was drawn using the R package Circlize v.0.4.8 (15).

BLASTn (42) was used to evaluate the presence/absence of the *fhaC* gene in 1649 *K. pneumoniae* strains isolated in 32 European countries as part of the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) (7), with the nucleotide sequence of the *fhaC* gene as a query. The presence/ absence of the *fhaC* gene was identified using megablast. Data were filtered considering 100% coverage and an identity of between 98.97% and 100%. A core-genome MLST (cg-MLST) was performed to describe the distribution of the *fhaC* gene. The cg-MLST relies on species-specific schemes with a fixed number of chromosomal target genes. Thus,

2,538 targets provided by SeqSphere+3.5.0 (Ridom) were used to compare *K. pneumoniae* isolates from this study with *K. pneumoniae* strains described in the EuSCAPE project (7). Data on the *fhaC* were included to enable examination of the distribution.

Construction of the knockout strains

A partial region of 771pb of *fhaC* gene was deleted from *K. pneumoniae* Kp3380 (KpST-15) strain and its derivative mutant Kp3380 Δ *kpiD* (16). Briefly, the pIJ773 plasmid was used as a template to amplify the apramycin resistance cassette flanked by FRT sites with primers that included 5' extensions with a 60pb homology region for the *fhaC* gene (Table 2). Homology regions flanking the *fhaC* gene fragment to be deleted were amplified for performance of a fusion PCR. Primers are listed in the Supplementary Appendix (Table S2). The three PCR fragments containing overlapping ends were assembled using a two-step PCR. For chromosomal gene replacement, the PCR product was electroporated into Kp3380 and Kp3380 Δ *kpiD*, previously transformed with the plasmid pACBSR-Hyg. Bacteria were incubated overnight on LB Agar supplemented with apramycin, and insertion of the apramycin cassette was confirmed by PCR. The Kp3380 and Kp3380 Δ *kpiD* derivative strain was grown on LB agar with apramycin (200 μ g/mL), at 37 °C for 3 d, and then incubated on LB agar with apramycin (200 μ g/mL) and LB agar with hygromycin (250 μ g/mL), overnight at 37 °C, to test for loss of the helper plasmid. For removal of resistance markers, cells were transformed with pFLP-Hyg and grown overnight at 30 °C. The mutants were then incubated at 43 °C in order to remove the apramycin resistance cassette.

Complementation of the mutant derivative Kp3380 Δ *fhaC* strain

The *fhaC* gene was PCR-amplified with specific oligonucleotides (Supplementary Appendix, Table S2) from the Kp3380 strain. The amplified DNA was purified, digested with SmaI and SacI (Thermo Fisher Scientific) and then ligated (T4 DNA ligase, Thermo Fisher Scientific) into a similarly digested expression pUCP24/T vector under control of the tetracycline gene promoter, previously obtained by our research group (17). The construct was checked by PCR analysis with specific primers (Appendix, Table S2). The derivative pUCP24/T_ *fhaC* plasmid was incorporated into the Kp3380 Δ *fhaC* mutant by electroporation for complementation studies. Strains were selected on agar plates with gentamicin (50 μ g/mL).

Bacterial adhesion to human epithelial cells and quantitative biofilm assay

The adhesion abilities of the *K. pneumoniae* strains to HT-29 cell line from human colorectal epithelial cells and biofilm formation were determined following the previously described procedure (17). ANOVA was used to indicate significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control. Kp3380 was considered the control group. Statistical significance is indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$.

***In vitro* competition assays**

In vitro competition experiments were performed with each of the isogenic pairs Kp3380/Kp3380 Δ *fhaC*, Kp3380/ Kp3380 Δ *KpiD* Δ *fhaC*. A 1:1 ratio of 0.5 McFarland standard of each corresponding pair of strains was prepared and diluted in 10mL of LB broth. Approximately 10^3 cells from each of the mixtures were inoculated and grown at 37°C and 180 rpm for 16 to 18 h, corresponding to approximately 20 generations. Serial 10-fold dilutions were plated in duplicate on LB agar alone and on

LB agar containing 200 µg/ml of apramycin to determine the total CFUs and the CFUs of the mutant strains, respectively, after overnight incubation at 37°C. The competition index (CI) was defined as the mutant/wild-type ratio. The CI values were calculated for each of the three independent competition experiments, and the median values were recorded.

Multiplex PCR amplification assay to detect *Klebsiella pneumoniae* ST15

A total of 294 isolates belonging to the nationwide survey of CPE (NSC) conducted by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and by the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (18) were tested. DNA extraction was performed using MagNa Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics). One colony of the strain was resuspended in 200 µl of PBS. Then, 180 µl of MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche Diagnostics) and 20 µl of Proteinase K, recombinant, PCR grade (Roche Diagnostics) were added to the sample. The mix was incubated at 65°C for 20 minutes. After 20 minutes, the 400 µl of sample was loaded into the MagnaPure to perform the extraction that will be eluted in 50 µl using the kit MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics). The program used was Total_NA_Plasma_external_lysis_V3.

The genes *fhaC* and *kpiD* were selected to perform a multiplex PCR. PCR reactions were carried out using 1 µl DNA solution, GoTaq® G2 Flexi (Promega) and 10 pmol of each gene-specific primer (Table S2) in a final volume of 25 µl. The PCR amplification conditions were the following: initial denaturation at 94°C for 2min, 30 cycles of 30s at 94°C, 30s at 56°C and 2,5 min at 72°C and a final elongation of 10 minutes at 72°C.

Results

Outbreak characteristics

Between February 2013 and October 2018, 5,340 *K. pneumoniae* non-duplicate isolates were detected in samples from inpatients and outpatients at the University Hospital of A Coruña, Spain. A total of 682 patients were found to be infected and/or colonized with OXA-48-producing *K. pneumoniae* (Kp-OXA-48) during the 6-year study. Over the years, this clone spread through hospital wards and emerged in the community, particularly in long term care facilities (LTCFs), resulting in an endemic situation. The annual incidence of Kp-OXA-48 increased from 3.2% in 2013 to 21.8% in 2016. In 2017 and 2018 we observed a significant decrease in the number of hospital-related cases. However, the incidence of this clone in LTCFs remained similar to that in previous years. The temporal distribution of cases and the variation in the percentage of carbapenem-resistance in *K. pneumoniae* during the study are shown in Figure 1. The peak of the outbreak occurred in 2016, coinciding with the highest rate of carbapenem-resistance in *K. pneumoniae* isolates.

The characteristics of the 682 patients infected and/or colonized by Kp-OXA-48 are summarized in Table 1. Most patients (427) acquired Kp-OXA-48 during an acute care hospital (ACH) stay, although a large number of cases (229) were linked to LTCFs. The 26 remaining cases were considered community-onset infection and/or colonization. Intestinal colonization was evaluated in 462 out of 682 patients, and 93.3% of these were found to be colonized by Kp-OXA-48. The cumulative incidence rate per 100,000 population by age group shows that the incidence increased with age of the patients. No significant differences between men and women, with a confidence interval of 95% (Relative risk of 1.13 (0.98-1.32)).

The urinary tract was the most common source of Kp-OXA-48 isolates (427), followed by the respiratory tract (64) and blood (46) (Table 1). Susceptibility testing of the 682 Kp-OXA-48 isolates revealed a broad antimicrobial drug-resistance profile.

Ceftazidime-avibactam, colistin, gentamycin and tigecycline were the most active antibiotics (Table 1). Susceptibility to fosfomycin and meropenem was 66.6% and 67.5%, respectively (Table 1).

Molecular epidemiology

In total, 48 representative Kp-OXA-48 isolates were selected for further molecular typing studies. PFGE results revealed that the 87.5% (42 isolates) belonged to a single major clone with a unique PFGE pattern (Supplementary Appendix, Figure S1). One isolate of each pulsotype was selected to determine the sequence type (ST). MLST analysis enabled us to identify this main clone as ST15 (KpST-15), which was the most prevalent ST found throughout the 6-year study. The remaining eight isolates belonged to ST-147 (3 isolates, KpST-147), ST-11 (1 isolate, KpST-11), ST-405 (1 isolate, KpST-405) and ST-551 (1 isolate, KpST-551).

Virulome and resistome analysis

We conducted a comparative genomic analysis of the five different STs (ST-15, ST-11, ST-147, ST-405 and ST-551) detected among the outbreak-related Kp-OXA-48 in order to examine the different genomic traits in relation to the clinical and epidemiological behaviour of the STs. The repertoire of virulence and resistance genes is shown in Figure 2. The KpST-15 clone had a unique set of virulence and resistance genes (Figure 2). While all isolates harboured OXA-48 located in an IncL/M conjugative plasmid, the KpST-15 was the only strain harbouring an IncR non-mobilizable plasmid carrying the β -lactamases OXA-1 and CTX-M-15, as well as the genes associated with resistance to aminoglycosides and quinolones (*aac(6')-Ib-cr*) and chloramphenicol (*catB3*). The CTX-M-15 was also encoded via chromosomes and plasmids in KpST-147 and KpST-405, respectively.

All five Kp-OXA-48 shared virulome characteristics; however, KpST-15 had a unique set of type 6 secretion system (T6SS)-related genes (*vgrG*, *sciN*, *ompA*, *impJ*, *impH*, *impF*, *icmF* and *dotU*) from locus II (19). In addition, two adherence-related systems were only harboured by KpST-15 isolate. The Chaperone Usher Pili system Kpi, recently described by our research group (17), and the two-partner secretion (TPS) system FhaB/FhaC were identified. Although the Kpi system is also present in the KpST-405 isolate, the *kpiD* fimbriae gene has nucleotide changes and deletions causing a frame shift in the coding sequence leading to a truncated non-functional product.

Role of the TPS FhaB/FhaC in adherence

The TPS FhaB/FhaC was functionally inactivated in KpST-15 (Kp3380) and its Kpi-defective derivative strain by partial deletion of a region of the *fhaC* gene. The outer membrane protein FhaC plays an important role in the secretion of the adhesin exoprotein FhaB to produce a functional TPS system. Mutant strains (Kp3380 Δ *fhaC* and Kp3380 Δ *kpiD* Δ *fhaC*) were used to investigate the role of both of these adherence-related systems in the ability of the epidemic KpST-15 strain to attach to abiotic and biotic surfaces. The capacity of KpST-15 isolate to form biofilm was found to be impaired when the *fhaC* gene was inactivated, and this effect was slightly higher when both the *fhaC* and *kpiD* genes were deleted (Fig. 3). Biofilm formed by the *fhaC*-defective and the *fhaC/kpiD*-defective strains was reduced by 34.2 % ($P < 0.05$) and 41.20 % ($P < 0.01$) respectively. Complementation of the knockout strains with the parental allele restored the wild-type phenotype.

The interactions between KpST-15 (Kp3380) or its derivative mutants and colorectal eukaryotic cells HT-29 were also examined. Cells were infected with the wild type strain Kp3380 and its adherence-defective mutant strains Kp3380 Δ *fhaC* and

Kp3380 $\Delta kpiD\Delta fhaC$ to determine the adherent phenotype and thus demonstrate the role of the *fhaC* gene in adherence. This approach revealed that significantly fewer Kp3380 $\Delta fhaC$ and Kp3380 $\Delta kpiD\Delta fhaC$ were recovered from infected cells than from cells infected with the wild type strain (Figure 4). When *fhaC* or *fhaC* plus *kpiD* genes were deleted the number of bacteria attached to HT-29 decreased by 52.71 % ($P < 0.0001$) and 71.36 % ($P < 0.0001$) respectively (Figure 4). The parental phenotype was restored in the complemented strain.

KpST-15 fitness is impaired when TPS FhaB/FhaC system and Kpi system are inactivated

In vitro competition experiments were performed with each of the isogenic pairs Kp3380/ Kp3380 $\Delta fhaC$ and Kp3380/Kp3380 $\Delta kpiD\Delta fhaC$. The competition index (CI), defined as the mutant/wild-type ratio, revealed that the *fhaC* and *kpiD* genes both affect the fitness of KpSt-15 strain, as fitness was clearly reduced in the Kp3380 $\Delta fhaC$ and Kp3380/Kp3380 $\Delta kpiD\Delta fhaC$ mutant strains. The median CI values obtained were 0.32 and 0.13 for Kp3380/ Kp3380 $\Delta fhaC$ and Kp3380/Kp3380 $\Delta kpiD\Delta fhaC$ respectively. These results indicate that FhaB/FhaC and Kpi systems are involved in the maintenance of biological competitiveness of *K. pneumoniae* ST-15 in vitro.

The TPS system FhaB/FhaC is closely associated with the high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15

The *fhaC* gene was detected in 10.25% (169 of 1,649) of isolates belonging to 12 different STs. The 85.8% (145 of 169 isolates) of *fhaC*⁺ *K. pneumoniae* belonged to ST-15, and all of the ST-15 isolates tested positive for the *fhaC* gene sharing the same aminoacidic sequence with KpST-15 (100% coverage and 100% identity) (Figure 5). The *fhaC* gene was also detected in 100% of the *K. pneumoniae* isolates belonging to ST-247, ST-323, ST-326, ST-337, ST-380, ST-397, ST-1243, ST-1630, ST-1961, ST-

2217 and ST-2279 (Figure 5). However, only the isolates belonging to ST-326 (2 isolates), ST-337 (1 isolate) and ST-1961 (1 isolate) shared exactly the same amino acidic sequence with KpST-15. All other isolates displayed amino acidic changes relative to the KpSt-15 gene.

The high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST15 is specifically detected by a multiplex PCR.

The positive PCRs showed two bands, corresponding to the *fhaC* and *kpiD* markers. The size of each of bands are 2127 bp in the case of the *fhaC* gene and 844 bp in the case of the *kpiD* gene. The analysis of 294 strains by PCR revealed that 32 isolates were positive for the two genes showing a pattern of two bands. Among that positive PCRs, 26 out of 32 belonged to *K. pneumoniae* ST15 and the remaining 6 isolates were false positives (isolates belonging to other STs different from ST15 that also carry the two markers in their genomes). The 262 isolates that were negative for the two marker genes were all true negatives. Based on the data obtained, we calculated the percentages of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (PNV). A sensitivity of 100% (26/26) and a specificity of 97,76% (262/268) were observed when the *fhaC* and *kpiD* genes were used as a targets. The PPV was 81,25% (26/32) and PNV 100% (262/262). The multiplex PCR results showed 100% concordance with the MLST and WGS results.

We analyze these values using the genome sequence of 1649 *K. pneumoniae* isolates belonging to the EuSCAPE database, wherein the MLST and the presence of *fhaC* and *kpiD* genes are known. The predicted values would be 100% sensitivity (145/145), 99,4% (1495/1504) specificity, 94,16% (145/154) PPV and 100% (1495/1495) NPV when the two markers are used.

Discussion

Outbreaks of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* have been documented in hospitals in several countries worldwide. The spread of specific high-risk clones harbouring plasmids that code for carbapenemases in the hospital environment is a major cause of the emergence of concerning carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. Although the KPC-type carbapenemases are the most widely distributed, the prevalence of OXA-48- type enzymes has increased significantly since first being described in 2001 (20) and these are now among the most frequently detected in Enterobacteriaceae (21).

Outbreaks caused by OXA-48-producing *K. pneumoniae* have been reported in different European countries. Romania, Spain and Turkey are among the European countries with the highest incidence of the OXA-48-producing *K. pneumoniae* (7). The spread of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* is frequently linked to specific high-risk clones such as *K. pneumoniae* sequence types 11, 15, 101 or 258/512 (1,7). We identified a large outbreak of OXA-48-producing *K. pneumoniae*. The predominant clone belonged to the high-risk ST-15 clone and emerged in the hospital in February 2013, initially affecting 23 patients. This MDR *K. pneumoniae* was found in many of the hospital wards and spread rapidly in the community. The ST-15 epidemic clone was able to persist for more than 6 years and eventually resulted in an endemic situation in the sanitary district, despite the strict control measures implemented. A total of 682 patients were infected and/or colonized by this epidemic clone. Most patients (427) acquired the Kp-OXA-48 clone during an acute care hospital (ACH) stay. This is consistent with recent findings that indicate healthcare institutions as important hotspots for the spread of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (7).

The alarming colonization rates (93.3% of patients) by this epidemic clone may encourage its persistence and explain the progression of the outbreak. Several decolonization treatments aimed at eradicating the microorganism from the patients' intestinal flora were prescribed, such as probiotics and oral colistin and gentamycin. However, all of these strategies failed, and controlling the dissemination of this type of epidemic clones is therefore challenging. In this context, a better understanding of the genomic traits that increase the transmissibility, pathogenicity and antibiotic resistance of this clone may be crucial for its early detection and thus for implementing effective control measures to prevent further spread.

The OXA-48 carbapenemase is usually carried by IncL broad-host-range plasmids (22). However, this epidemic plasmid has previously been associated with specific *K. pneumoniae* STs (i.e. ST15) with a superior ability to cause outbreaks and continuous global dissemination. A high prevalence of within-patient OXA-48-carrying plasmid transfer among enterobacteria, which promotes long-term colonization with carbapenem-resistant bacteria, has been reported (23). However, this study revealed that *K. pneumoniae* was the most frequently disseminated bacterial species among patients.

We suggest that the specific characteristics of this clone in combination with specific epidemic plasmids may explain the success of the KpST-15 and its clinical and epidemiological behaviour.

We conducted a comparative genomic analysis of the 5 different outbreak-related Kp-OXA-48 sequence types (ST-15, ST-11, ST-147, ST-405 and ST-551) to identify the genomic traits that KpST-15 possesses that provide it with the ability to outcompete other *K. pneumoniae* clones.

We found that the KpST-15 clone had a unique set of virulence and resistance genes, being the only strain harbouring an IncR immobile plasmid carrying the β -lactamases OXA-1 and CTX-M-15, as well as the genes associated with resistance to aminoglycosides and quinolones (*aac(6')-Ib-cr*) and chloramphenicol (*catB3*). These resistance genes were generally only found in KpST-15, although CTX-M-15 was also found in KpST-405 and KpST-147, located in an IncFII/IncFIB plasmid and on the chromosome, respectively.

In addition, two adherence-related systems were only harbored by the KpST-15 isolate. The Chaperone Usher Pili system Kpi and the two-partner secretion system FhaB/FhaC. Although the Kpi system is also present in the KpST-405 isolate, the *kpiD* fimbriae gene has nucleotide changes and deletions causing a frame shift in the coding sequence leading to a truncated, non-functional product.

In a previous study, our research group investigated the role of the Kpi system in *K. pneumoniae* persistence in the hospital environment. This pilus system is involved in biofilm formation and adherence, as well as in the intestinal colonizing capacity of the pathogen (17).

In this study, we have identified for the first time an additional genomic trait, i.e. the presence of the TPS system FhaB/FhaC, in *K. pneumoniae*. This TPS system has been associated with the pathogenic potential of an outbreak-related *Acinetobacter baumannii* strain (24). Other related FHA systems, including the FHA from *Bordetella pertussis* (25), HecA from *Erwinia chrysanthemi* (26) and HMW1/2 from *Haemophilus influenzae* (27), have also been described as adhesins that play a major role as virulence factors in these species (28). Our findings also demonstrate that the FhaB/FhaC system promotes biofilm formation and adherence to intestinal eukaryotic cells in *K. pneumoniae*. Analysis of the EuSCAPE *K. pneumoniae*

collection revealed that the FhaB/FhaC system is more closely associated with the ST15 clone than the Kpi system.

Finally, we also observed that FhaB/FhaC and Kpi systems are involved in maintaining the biological competitiveness of *K. pneumoniae* ST-15 in vitro. This suggests that these systems may provide ST-15 with the ability to outcompete other *K. pneumoniae* STs that do not harbour these adherence-related systems. These beneficial factors can exacerbate epidemic dispersal between patients, hospitals and different environments. Considering the characteristics shared by MDR high-risk clones (29), the presence of these systems may be crucial for the epidemic success of the worldwide-disseminated *K. pneumoniae* ST-15. In light of our findings, these systems may positively contribute to persistence of the clone in the host for long time intervals and its effective transfer between different hosts. Moreover, these systems are responsible for the enhanced pathogenicity and fitness displayed by *K. pneumoniae* ST-15. Altogether, the study findings indicate that these two factors, clearly associated with this specific ST, may be considered important genomic traits or biomarkers that could be used to monitor the dissemination of this high-risk clone. . In this context, we have proposed the use of both biomarkers to design a rapid molecular detection test. Previous studies had used multiplex PCR to distinguish between carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains and hypervirulent *K. pneumoniae* isolates (30), as well as for the detection of ESBL in *Enterobacteriaceae* (31). Considering the proven use of these techniques, we have designed a multiplex PCR based on the detection of the two ST15-related genes *fhaC* and *kpiD* to specifically detect the high-risk clone *K. pneumoniae* ST15. The rapid and early detection of this high-risk clone would be a valuable tool for monitoring the efficient dissemination of *K. pneumoniae* ST15. Considering the role

of this clone in the increasing rate of antimicrobial resistance worldwide, the proposed method may be useful in reducing the advance of the antimicrobial resistance crisis.

Acknowledgements

This work was supported by projects PI18/00501 (awarded to GB), p-01216A and IJCI-2016-29524 (awarded to AP), funded by the *Instituto de Salud Carlos III*, Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MEIC). MG and IG acknowledge support from the MEIC through the Instituto de Salud Carlos III and the 2014-2020 Smart Growth Operating Program, to the EMBL partnership and co-financing with the European Regional Development Fund (MINECO/FEDER, BIO2015-71792-P). They also acknowledge the support of the Centro de Excelencia Severo Ochoa and the Generalitat de Catalunya, through the Departament de Salut, Departament d'Empresa i Coneixement and the CERCA Programme.

Author Bio

Eva Gato is a microbiology researcher at University Hospital of A Coruña, Spain. Her research focuses on several aspects of microbiology regarding antimicrobial resistance and microbial pathogenesis in order to fight Multi-Drug Resistant pathogens.

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae-8 April 2016. Stockholm. Ecdc. 2016;
2. WHO. Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. Vol. 38, Saudi Medical Journal. 2017. p. 444.
3. Frieden T. Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. 2013.

4. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. Vol. 41, FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press; 2017. p. 252–75.
5. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629–61.
6. Baker S, Thomson N, Weill F-X, Holt KE. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens.
7. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. Nat Microbiol. 2019;4(11):1919–29.
8. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE, C Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nature Reviews Microbiology Nature Research; Jun 1, 2020 p. 344–59.
9. Koskinen K, Penttinen R, Örmälä-Odegrip AM, Giske CG, Ketola T, Jalasvuori M. Systematic Comparison of Epidemic and Non-Epidemic Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Feb 23;11.
10. Machuca J, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Mora-Navas L, Mediavilla-Gradolph C, López-Rodríguez I, et al. OXA-48-Like-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Spain in 2014–2015. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Jan 1;63(1).
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. Vol. 33, Journal of Clinical Microbiology. 1995. p. 2233–9.

12. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4178–82.
13. Gato E, Constanso IP, Rodiño-Janeiro BK, Guijarro-Sánchez P, Alioto T, Arroyo MJ, et al. Occurrence of the *p019* gene in the *bla*_{KPC} -harbouring plasmids: adverse clinical impact for direct tracking of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. J Clin Microbiol [Internet]. 2021 May 12 [cited 2021 May 18]; Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00238-21>
14. Gato E, Constanso IP, Candela A, Galán F, Rodiño-Janeiro BK, Arroyo MJ, et al. An improved MALDI-TOF MS data analysis pipeline for the identification of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* . J Clin Microbiol. 2021 May 5;
15. Gu Z, Gu L, Eils R, Schlesner M, Brors B. Circlize implements and enhances circular visualization in R. Bioinformatics. 2014;30(19):2811–2.
16. Huang TW, Lam I, Chang HY, Tsai SF, Palsson BO, Charusanti P. Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. BMC Res Notes [Internet]. 2014;7:13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398052>
17. Gato E, Vázquez-Ucha JC, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Martínez-Gutián M, et al. Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15 . Proc Natl Acad Sci. 2020;117(29):17249–59.
18. Vázquez-Ucha JC, Seoane-Estévez A, Rodiño-Janeiro BK, González-Bardanca M, Conde-Pérez K, Martínez-Gutián M, et al. Activity of imipenem/relebactam against a Spanish nationwide collection of carbapenemase-producing Enterobacterales. J Antimicrob Chemother. 2021 May 12;76(6):1498–510.

19. Sarris PF, Zoumadakis C, Panopoulos NJ, Scoulica E V. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. *Infect Genet Evol.* 2011;11(1):157–66.
20. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):15–22.
21. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. Vol. 33, *Clinical Microbiology Reviews.* American Society for Microbiology; 2020.
22. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):559–62.
23. León-Sampedro R, DelaFuente J, Díaz-Agero C, Crellen T, Musicha P, Rodríguez-Beltrán J, et al. Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat Microbiol.* 2021;
24. Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence* [Internet]. 2017;8(6):959–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858524>
25. Melvin JA, Scheller E V., Noël CR, Cotter PA. New insight into filamentous hemagglutinin secretion reveals a role for full-length FhaB in *Bordetella virulence*. *MBio.* 2015 Jul 18;6(4).
26. Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia*

chrysanthemi EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 1;99(20):13142–7.

27. St. Geme JW, Yeo HJ. A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. Vol. 17, Trends in Microbiology. Trends Microbiol; 2009. p. 355–60.

28. Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. Vol. 1694, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. Biochim Biophys Acta; 2004. p. 235–57.

29. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Oct 1;64(10).

30. Yu F, Lv J, Niu S, Du H, Tang YW, Pitout JDD, et al. Multiplex PCR analysis for rapid detection of *klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistant (sequence type 258 [ST258] and ST11) and hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. J Clin Microbiol. 2018 Sep 1;56(9):731–49.

31. Monstein HJ, Östholm-Balkhed Å, Nilsson M V., Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. APMIS. 2007 Dec 1;115(12):1400–8.

Address for correspondence: Astrid Pérez, Microbiology Research Unit, Institute for Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), As Xubias s/n, 15006 A Coruña, Spain; email: astrid.perez.gomez@gmail.com ; Germán Bou, Microbiology Department, University Hospital of A Coruña (HUAC), As Xubias s/n, 15006 A Coruña, Spain; email: german.bou.arevalo@sergas.es

Table 1. Characteristics of 682 patients colonized or infected with Kp-OXA-48 between February 2013 and October 2018, in Spain.

Characteristic	Value^a
Confirmed case	648 (98.8)
Presumed case^b	34 (1.2)
Female	378/682 (55.4)
Age in years, mean \pm SD	74.4 \pm 16.5
Facility where infection/colonization acquired^c	
Acute care hospital	427 (62.6)
Long-term care facility	229 (33.6)
Community-onset	26 (3.8)
Site(s) of bacterial isolation	
Blood	46 (6.7)
Urine	427 (62.6)
Urine and rectal swab	204 (29.9)
Respiratory samples	64 (9.4)
Skin and soft tissues samples	31 (4.5)
Rectal swab	93 (13.6)
Other	21 (3.1)
Antibiotic susceptibility (n=475) d,e,f	
Ampicillin	0 (0)
Cefotaxime	39 (9.6)
Cefepime	39 (9.6)
Ertapenem	0 (0)
Meropenem ^g	164 (67.5)
Imipenem	328 (72.5)
Gentamycin	441 (94.8)
Tobramycin	79 (17)
Tigecycline ^g	229 (85)
Fosfomycin	292 (66.6)
Colistin ^g	233 (98.3)
Ciprofloxacin	8 (1.7)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	33 (7.2)
Ceftazidime-avibactam ^h	48 (100)
Colonization samples	137
Clinical samples	545

Table footnotes:

^a The values are presented as numbers (%) except where noted.

^b Isolates were not tested by PCR.

^c A case was defined as hospital-acquired if infection or colonization was detected in a person ≥ 48 hours after admission.

^d Number and percentage of isolates susceptible to each antibiotic are shown.

^e Susceptibility interpretations are based on 2019 Eucast Clinical Breakpoints for *Enterobacteriaceae*.

^f Susceptibility data correspond to Kp-OXA-48 isolated from urine and blood samples.

^g Susceptibility to meropenem, tigecycline and colistin was tested in 49%, 52% and 48% of Kp-OXA-48 isolates.

^g Susceptibility to ceftazidime-avibactam was tested in 48 representative, outbreak-related Kp-OXA-48 isolates.

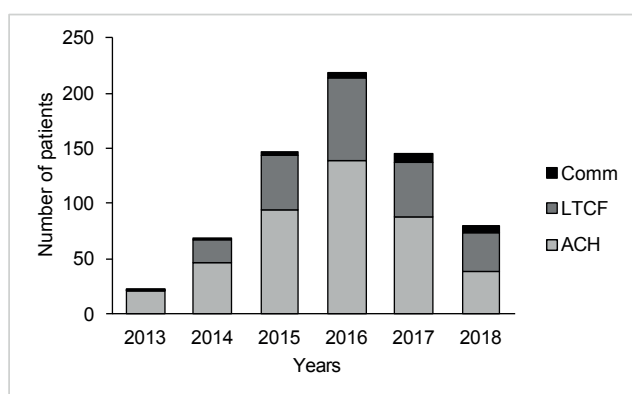


Figure 1. Legend. Distribution of the patients infected and/or colonized with Kp-OXA-48 isolates. Facility where the clone was acquired is indicated: Comm, Community-onset; LTCF, Long Term Care Facility and ACH, Acute Care Hospital.

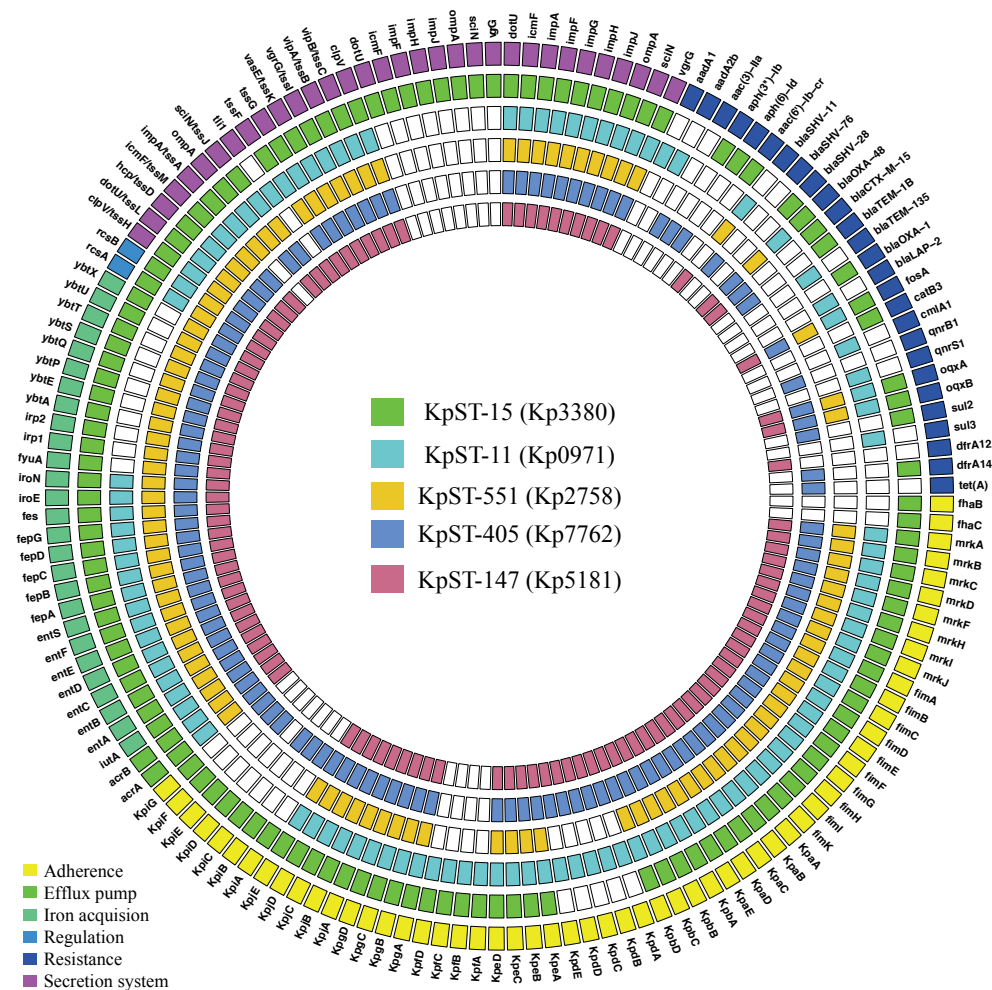


Figure 2. Legend. Ideogram of the virulome and resistome data generated from whole-genome comparative genomics for five Kp-OXA-48 strains belonging to five different sequence types (STs). The ideogram was based on the presence and absence of virulence and resistance genes among the five *K. pneumoniae* strains. Coloured boxes represent presence, and white boxes represent absence. Each individual strain is indicated by a different colour. KpST-15 isolate was used as a template for the composite outer ring, and the gene function is indicated by different colours. The ideogram was drawn using the R package Circlize, with some additional scripting in R to refine the positions of the labels.

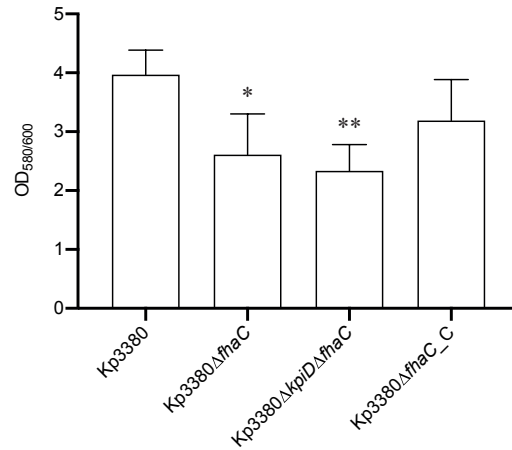


Figure 3. Legend. Quantitative analysis of biofilm formation of *K. pneumoniae* isolates. The biofilms formed by the wild type and derivative strains were quantified by crystal violet staining. Six independent biological replicates were analyzed. ANOVA was used to detect any significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control (Kp3380). Statistical significance is indicated (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). The values shown are means, and error bars indicate standard deviations.

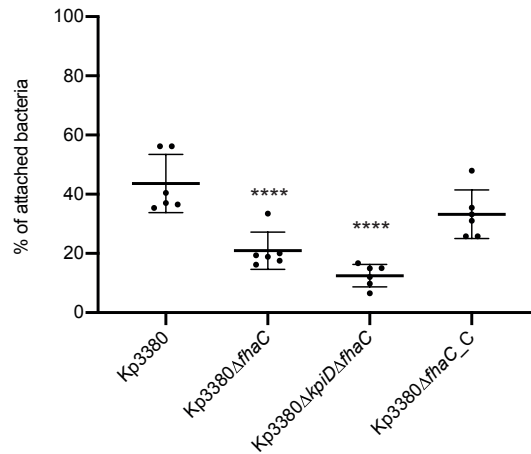


Figure 4. Legend. Quantification of the adherence of *Klebsiella pneumoniae* strains to HT-29 intestinal colorectal cells. Bacterial adherence is reported as the percentage of attached bacteria relative to the number of bacteria used to infect the eukaryotic cells (assumed to be 100%). The data represent 6 independent biological replicates. ANOVA was used to detect any significant differences between the groups, and a post hoc Tukey's test was used to determine the difference between each group and the respective control (Kp3380). Statistical significance is indicated (**** $P \leq 0.0001$). Values shown are means, and error bars indicate standard deviations.

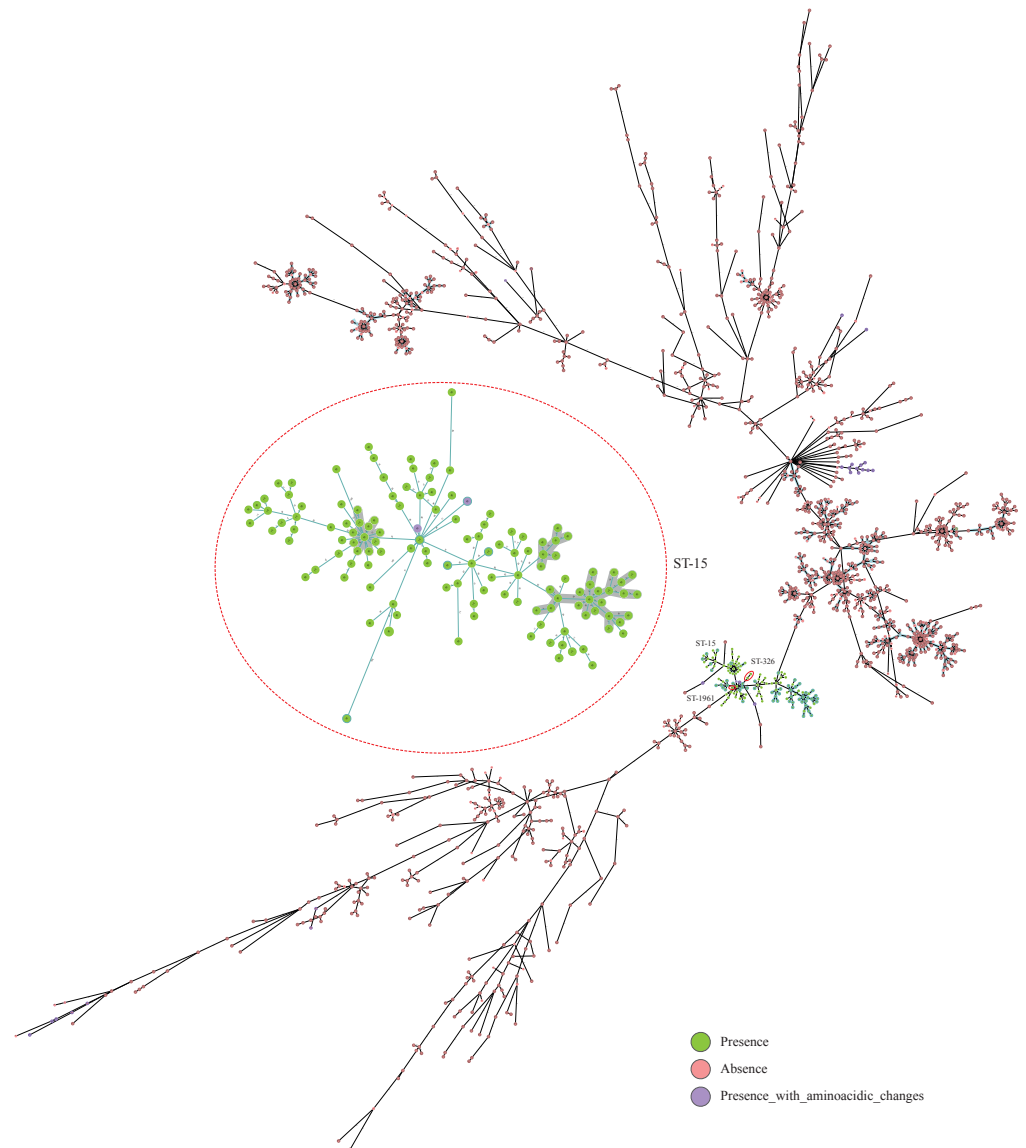


Figure 5. Legend. Phylogenetic tree of 1649 *K. pneumoniae* isolates collected during the EuSCAPE survey. The colours of the isolates indicate absence/presence of the *fhaC* gene and whether or not the gene has amino acid changes. Blue shadow indicates that isolates are genetically related.

Supplementary Appendix

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in the present study.

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Reference or Source
OXA-48-producing <i>K. pneumoniae</i> strains		
Kp7762	Outbreak-related <i>K. pneumoniae</i> ST-405 strain isolated from wound sample in 2016. Barcode AN2343 in bioproject PRJEB39112.	This study
Kp0971	Outbreak-related <i>K. pneumoniae</i> ST-11 isolated from urine sample in 2016. Barcode AN2345 in bioproject PRJEB39112.	This study
Kp2758	Outbreak-related <i>K. pneumoniae</i> ST-551 isolated from urine sample in 2016. Barcode AN2346 in bioproject PRJEB39112.	This study
Kp5181	Outbreak-related <i>K. pneumoniae</i> ST-147 isolated from urine sample in 2017. Barcode AN2342 in bioproject PRJEB39112.	This study
Kp3380	Outbreak-related <i>K. pneumoniae</i> ST-15 isolated from wound exudate in 2015. Barcode AN2344 at bioproject PRJEB39112.	This study

KpST-15 (Kp3380) derivative strains			
Kp3380Δ <i>kpiD</i>	<i>kpiD</i> -defective Kp3380 mutant strain	(17)	
Kp3380Δ <i>fhaC</i>	<i>fhaC</i> -defective Kp3380 mutant strain	This study	
Kp3380Δ <i>kpiD</i> Δ <i>fhaC</i>	<i>kpiD</i> and <i>fhaC</i> -defective Kp3380 mutant strain	This study	
Kp3380Δ <i>fhaC</i> _C	Kp3380Δ <i>fhaC</i> strain harbouring pUCP24/T_ <i>fhaC</i>	This study	
<i>E. coli</i> strains			
TG1	Host strain used for cloning procedures	Invitrogen	
Plasmids			
pIJ773	Template vector for apramycin gene Amplification	(16)	
pACBSR-hyg	Plasmid (hygromycin) containing an arabinose-inducible λ-Red recombinase	(16)	
pFLP-hyg	Plasmid (hygromycin) containing a heat shock inducible FLP recombinase and a p15A replicon	(16)	

pUCP24/T	Modified pUCP24 expression vector (17) (tetracycline promoter)	
pUCP24/T_ <i>fhaC</i>	pUCP24/T containing the <i>kpiD</i> gene	This study

Table S2. Oligonucleotides used in the present study.

Primer name	Sequence	Use in the present study
		Amplification of the <i>fhaC</i> UP region and testing the <i>fhaC</i> gene deletion
<i>fhaC</i> _up_fow4	cgccgtcaccggatattcat	
	gcgaggctggcggaacttcgaagttcctatactttctaga	
<i>fhaC</i> _up_rev4	gaataggaacttcgaactgcaggtcgacggatccccgga attcatcgctgtctgcgtaag	Amplification of the <i>fhaC</i> UP region
	agtcgattggctgagctcataagttcctattccgaagttccta	
<i>fhaC</i> _down_fow1	ttctctagaaagtataggaacttcgaagcagctccagccta cacaaccgccctcagcaaaatc	Amplification of the <i>fhaC</i> DOWN region
		Amplification of the <i>fhaC</i> DOWN region and testing the <i>fhaC</i> gene deletion
<i>fhaC</i> _down_rev1	gctaaaggataccggcgaa	
	gcgcctggtggtgatgccgggttatatccgtgaagccagg	Amplification of apramycin resistance cassette
<i>fhaC</i> _apra_fow4	cttacgcaggacagcgatgaattccgggatccgtcgacc	
	ccagggcaaaaggcaaattgagctgagcattgaattgcag	Amplification of apramycin resistance cassette
<i>fhaC</i> _apra_rev1	gattttgctgagggcggttgtaggctggagctgcttc	
<i>fhaC</i> _Compl_SmaI_Fow	tccccgggggaatgggttggtgtattaaatg	Cloning of <i>fhaC</i> gene into the

		pUCP24/T plasmid for complementation
fhaC_Compl_SacI_Rev	cgagctcgtagctccagctgacgc	Cloning of <i>fhaC</i> gene into the pUCP24/T plasmid for complementation
pUCp24_check_Fw	gcctgccttcaggctgcgaactgtt	Testing of the plasmid construction pUCP24/T_ fhaC for complementation
pUCp24_check_Rv	tggcacgacaggttcccgaactgga	Testing of the plasmid construction pUCP24/T_ fhaC for complementation
fhaC_Fow	tcgcgctaagtctctc	Detection of <i>K. pneumoniae</i> ST15 high risk clone
fhaC_Rev	tacgccagcccgatga	Detection of <i>K. pneumoniae</i> ST15 high risk clone
kpiD_fow	ggaattgaaagtgtgacccc	Detection of <i>K. pneumoniae</i> ST15 high risk clone
kpiD_rev	ctttatcgctgcctgtgtatc	Detection of <i>K. pneumoniae</i> ST15 high risk clone

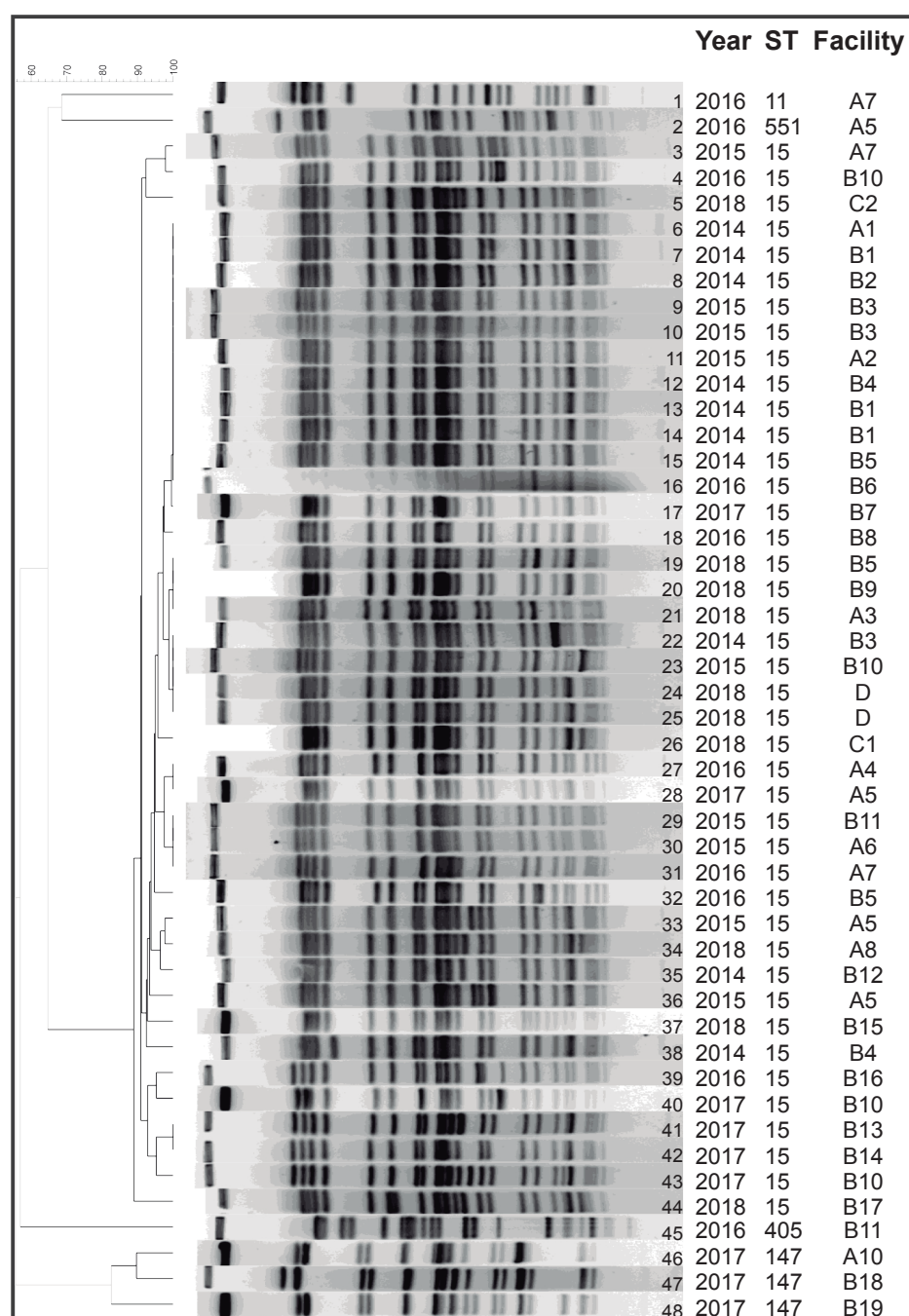


Figure S1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of 48 outbreak-related Kp-OXA-48 isolates. Isolates were selected from different years and settings as a representative sample of the outbreak. A dendrogram based on Dice's coefficient was constructed using Phoretix 5.0 software (Nonlinear Dynamics Ltd, UK). A, outpatient clinic; B, acute care hospital; C, long-term care facility and D, community-onset. Numbers indicate specific facilities.

CAPÍTULO IV. Actividad antiadhesiva de un extracto polifenólico de *Vaccinium corymbosum* dirigido a la colonización intestinal causada por *Klebsiella pneumoniae*.

Resumen.

K. pneumoniae se considera uno de los patógenos más importantes responsable de graves infecciones comunitarias y hospitalarias. La elevada incidencia de las infecciones por *K. pneumoniae* se ve favorecida por la capacidad de este patógeno para colonizar el tracto gastrointestinal, favoreciendo el progreso a una posterior infección. La adhesión de la bacteria a diferentes tipos celulares permite la colonización del hospedador, lo que contribuye positivamente a su diseminación y a la aparición de brotes nosocomiales. El bloqueo de la adherencia bacteriana a la superficie intestinal podría inhibir o reducir la capacidad de la bacteria de colonizar el tracto gastrointestinal y, en consecuencia, limitar la propagación global de las cepas de *K. pneumoniae*.

Dado que se ha demostrado que varios compuestos polifenólicos tienen propiedades antiadhesivas, en este estudio quisimos evaluar la posible actividad antiadhesiva de un extracto de arándano de la especie *Vaccinium corymbosum* con el objetivo de prevenir la colonización del hospedador y la posterior infección.

El extracto de arándano se obtuvo con un sistema de temperatura ambiente a escala media (*medium scale ambient temperature system*; **MSAT**) utilizando un disolvente acuoso salino. El contenido polifenólico se determinó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (*liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry*; **LC-MS/MS**). Se ha observado que el extracto de arándano obtenido contiene una amplia variedad de compuestos fenólicos, incluidos los polifenoles más polares (principalmente no

flavonoides), los compuestos medianamente polares (flavan-3-oles y la mayoría de las procianidinas) y los compuestos poco polares (flavonoles y antocianinas). Para el estudio de la bio-actividad de este extracto se seleccionó la cepa Kp3380, aislada durante un brote hospitalario, por su alta capacidad de adhesión a superficies bióticas y abióticas y su gran capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal. El extracto de arándano fue capaz de inhibir significativamente la formación de *biofilm* y la adhesión bacteriana a las células colorrectales HT-29 por parte de la cepa Kp3380. Aunque diferentes compuestos polifenólicos como las antocianidinas (malvidina, delphinidina y cianidina) y un ácido hidroxicinámico (cafeico) demostraron capacidad para reducir la adhesión bacteriana, el extracto no fraccionado fue más activo que cualquier compuesto polifenólico individual. Además, el extracto mostró un potencial considerable como terapia de descolonización intestinal en un modelo murino.

Dado que se han realizado pocos estudios sobre el uso del extracto de arándano como estrategia de descolonización o como coadyuvante de los tratamientos existentes, los resultados obtenidos en este estudio podrían abrir la puerta al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el manejo de infecciones causadas por *K. pneumoniae*.



Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*

Eva Gato^a, Alicja Rosalowska^b, Marta Martínez-Gutián^a, Marta Lores^{b,1}, German Bou^{a,1}, Astrid Pérez^{a,*,1}

^a Departamento de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC), Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña, Spain

^b Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Klebsiella pneumoniae
Blueberry extract
Polyphenols
Anti-adhesion
Gastrointestinal colonization

ABSTRACT

The therapeutic effect of *Vaccinium* polyphenols against uropathogens has been widely studied. Most attention has focused on the antimicrobial activity against P-fimbriated *Escherichia coli* strains. The present study investigated the anti-adhesive and anti-biofilm activity of a saline extract of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) targeting intestinal colonization by a highly adherent *Klebsiella pneumoniae* strain. This strain, responsible for a large outbreak of infection in Spain, was selected on the basis of its remarkable capacity to colonize the gastrointestinal tract of patients.

The blueberry extract was obtained using a medium scale ambient temperature system (MSAT) in a novel approach based on the use of an aqueous solvent and addition of mineral salts. The polyphenolic content was determined by liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS). The findings confirmed that the blueberry extract is a rich source of phenolic compounds, including the most polar polyphenols (mostly non-flavonoids), intermediate polarity compounds (flavan-3-ols and most procyanidins) and low polarity compounds (flavonols and anthocyanins). The extract significantly inhibited biofilm formation and bacterial adhesion to HT-29 colorectal cells by a highly adherent multidrug-resistant *K. pneumoniae*. Although some individual anthocyanidins (malvidin, delphinidin and cyanidin) and one hydroxycinnamic acid (caffeic acid) proved capable of reducing bacterial adhesion, the unfractionated extract was more active than any of the individual polyphenolic compounds. In addition, the extract displayed considerable potential as an intestinal decolonization treatment in a murine model. The study findings demonstrate the potential value of the *V. corymbosum* extract as an alternative treatment for *K. pneumoniae* infections.

1. Introduction

Infectious diseases remain one of the leading causes of death and an ongoing global public health challenge. Infections caused by multi-drug resistant pathogens are of particular concern, such as those belonging to the ESKAPE group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species), which are the principal causes of nosocomial infections [1]. The pathogenicity, transmissibility and resistance phenotypes of these bacterial species favour their spread and hinder the fight

against them [1]. In its 2019 report, the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) included carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the group of pathogens considered an urgent threat [2]. These pathogens, particularly *K. pneumoniae*, often show resistance to almost all antibiotics available in clinical practice, thus severely limiting the therapeutic options available [3,4]. *K. pneumoniae* is considered one of the most important pathogens causing serious community- and hospital-acquired infections. The emergence of clinically important clones of this species has contributed to the spread of various resistance genes, which have played an important role in the global emergence of

Abbreviations: BBHE, Blueberry HBSS Extract.

* Corresponding author at: Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), As Xubias 84, 15006, A Coruña, Spain.

E-mail address: astrid.perez.gomez@sergas.es (A. Pérez).

¹ These senior authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.biopharm.2020.110885>

Received 20 August 2020; Received in revised form 9 October 2020; Accepted 12 October 2020

Available online 28 October 2020

0753-3322/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

antibiotic resistance. The high incidence of *K. pneumoniae* infections is favoured by the ability of this pathogen to colonize the gastrointestinal (GI) tract, which is associated with subsequent infection [5,6]. Therefore, GI tract colonization represents an important reservoir for strains involved in healthcare-associated infections [7]. The ability of the bacterium to adhere to several different cell types enables host colonization, favouring nosocomial outbreaks and the spread of infection. Disrupting bacterial adherence to the intestinal surface could potentially target GI tract colonization and consequently limit the global spread of multidrug-resistant *K. pneumoniae*.

Previous studies have reported the functional capacity of berry compounds to inhibit bacterial adhesion to epithelial bladder cells and thus help to prevent urinary tract infections (UTIs) caused by *Escherichia coli* [8,9]. *Vaccinium* berries are rich sources of bioactive compounds, mainly polyphenols, with proven health benefits [10,11]. Polyphenols form part of the chemical defensive arsenal of plants [12], essentially as a result of the inherent physicochemical properties of the phenol functional group [10]. Despite the immense structural variety of the phenol functional group, *Vaccinium* berries have some polyphenols in common, including anthocyanidin glycosides, flavonols (quercetins and related), flavanols (catechins and related), phenolic acids (mainly hydroxycinnamic acids) and complex phenolic polymers, mainly proanthocyanidins (monomeric and oligomeric forms) and ellagitannins [13,14]. The therapeutic use of the genus *Vaccinium* has a long history in America, Europe and Asia [15,16]. The antimicrobial activity of different berries and phenolic compounds isolated from berries has been widely described in Gram-negative and Gram-positive microorganisms [15–17] and varies depending on the extraction method and solvent used to obtain the extracts. The polyphenolic content of berry extracts depends on the phenotypic and agro-environmental conditions and the extraction technique and solvents used. Existing data suggest that the antimicrobial activity of a multi-component extract containing most of the original polyphenols will be higher than that of a single-component extract [10,14], due to the synergistic interactions between the compounds. The raw, unfractionated extracts will thus potentially have a powerful broad-spectrum antibacterial action. The antimicrobial activity has also been associated with inhibition of adherence to biotic and abiotic surfaces. Cranberry A-type proanthocyanidins (PACs) have been shown to prevent adhesion of P-fimbriated uropathogenic *E. coli* to epithelial bladder cells by inhibiting Type 1 fimbriae, which play a key role in bacterial adhesion [18,19]. Recently published findings suggest that oligosaccharides may also play an important role in anti-adhesion activity [20–22]. Berry A-type PACs have been reported to decrease intestinal colonization by *E. coli* and, consequently, epithelial cell invasion by extra-intestinal pathogenic *E. coli* [23]. Moreover, adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells is inhibited by a high-molecular-weight constituent of cranberry [24] and, in the US, a PAC-type drug (Crofelemer) has been approved by the US FDA for the treatment of non-infectious diarrhoea in HIV patients [25]. There is increasing interest in the role of berries in digestive health, and some studies have explored the effects of berries on the composition of the intestinal microbiota [26,27].

As several polyphenolic compounds have been shown to have anti-adhesive properties [28,29], we aimed to test the potential anti-adhesion capacity of a raw, unfractionated berry extract to prevent host colonization and subsequent infection. To this end, we used an extraction process, previously successfully used to obtain polyphenols from other plant sources [30,31], to yield a blueberry extract for testing against an outbreak-related multidrug-resistant *K. pneumoniae* (Kp3380). The Kp3380 strain was involved in a large outbreak caused by a highly adherent ST-15 OXA-48-producing *K. pneumoniae* clone in Spain. This clinical strain has shown a remarkable ability to adhere to both biotic and abiotic surfaces, as well as a high capacity to colonize the GI tract of patients [32]. These pathogenic characteristics make this strain a good model for testing the efficacy of the berry extract to target GI tract colonization.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Washed sea sand (200–300 µm, Scharlau, Barcelona, Spain) was used as a dispersant. Anhydrous sodium sulphate was used as a desiccant (Carlo Erba Reagents S.A.S., Val de Reuil, France). Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) was used as the extraction solvent. Ultrapure water was produced in the laboratory with a Milli-Q gradient system (Millipore, Bedford, MA, USA). Methanol (LC-MS Chromasolv®, Fluka, Madrid, Spain) and formic acid (98–100 %) (Merck, Darmstadt, Germany) were used in the chromatographic mobile phase. Pure standards of caftaric acid, caffeic acid, quercetin, isoquercetin (quercetin-3-glucoside), rutin (quercetin-3-rutinoside), chlorogenic acid, catechin, epicatechin gallate and procyanidins B1 and B2 were supplied by Fluka Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Protocatechuic acid, epicatechin and quercetin-3-glucuronide were obtained from HWI ANALYTIK GmbH; gallic acid was obtained from Sigma-Aldrich. The purity of all of the standards used was higher than 95 %, except for isoquercetin (91.1 %). The names and CAS numbers of the studied compounds are listed in Table 1. Individual standard stock solutions (1,000–10,000 µg/mL) were prepared in methanol (MS/MS grade). Working solutions in water containing the target analytes (10–1,000 ng/mL) were obtained by appropriate dilution of stock solutions for quantitation purposes. Stock and working solutions were stored in a freezer at –20 °C and were protected from light.

2.2. Bacterial strain

The outbreak-related strain Kp3380 was selected on the basis of its multidrug-resistant and highly adherent phenotype. Several resistance determinants in Kp3380 were identified using whole-genome sequencing (accession number PITM000000000). This clinical strain has been found to harbour the carbapenemase OXA-48 and the ESBL CTX-M-15, as well as other β-lactamases such as OXA-1, SHV-28, SHV-106 and TEM-1. Genes associated with resistance to aminoglycosides (*aph(3'')-Ib*, *aac(6')Ib-cr* and *aph(6)-Ib*), quinolones (*aac(6')Ib-cr*, *oqxA* and *oqxB*), chloramphenicol (*catB3*), sulfonamide (*sul2*) and trimethoprim (*dfrA14*) were also found in this strain. Moreover, the Kp3380 resistome includes a *phoQ* mutation that confers resistance to colistin. All of these resistance determinants contribute to the Kp3380 multidrug-resistance profile. Thus, this strain showed resistance to carbapenems (ertapenem), cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, cefepime and cefoxitin), monobactam (aztreonam), quinolones (ciprofloxacin and levofloxacin), aminoglycosides (amikacin and tobramycin), colistin, tigecycline and fosfomycin.

2.3. Blueberry samples and culture conditions

The blueberries used in this study belong to the genus *Vaccinium* (family *Ericaceae*). The species *Vaccinium corymbosum* (Ventura), grown in Peru, was the raw material used to obtain the blueberry extract (BBHE) for experimentation. Ventura is an early ripening variety, with medium to large firm fruit, light coloured skin and white to red pulp. The bacterial strain was grown in LB broth (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract and 10 g/L NaCl), LB broth supplemented with blueberry extract at different concentrations, or LB agar plates (LB broth supplemented with 20 g/L of agar). The strain was routinely grown at 37 °C with shaking and was stored at –80 °C in LB broth with 10 % glycerol.

2.4. Extraction procedure and analytical characterization of the extract

The blueberry extract was produced in a medium scale ambient temperature system (MSAT) [31] consisting of a cylindrical glass column (20 cm height x5 cm external diameter) adapted for the specific purposes of the study. Twenty g of blueberry sample yielded a net

Table 1Quantification of polyphenols in blueberry extract, expressed in $\mu\text{g/g}$ (in lyophilized extract); average data from two LC-MS/MS runs.

Plant Polyphenol Group	Compound name	CAS Number	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Non-flavonoids	Benzoic acids	Gallic Acid	149-91-7
		Protocatechuic Acid	99-50-3
	Hydroxycinnamic acids	Caffeic Acid	331-39-5
		Chlorogenic Acid	327-97-9
	Phenolic aldehydes	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	139-85-5
	Flavan-3-ols	Catechin	225937-10-0
		Epicatechin	490-46-0
		Procyanidine A2	41743-41-3
		Procyanidine B1	20315-25-7
	Flavan-3-ols oligomeric derivatives	Procyanidine B2	29106-49-8
Flavonoids		Procyanidine C1	37064-30-5
		Quercetin	117-39-5
		Isoquercetin (Quercetin-3-glucoside)	482-35-9
	Flavonols	Rutin (Quercetin-3-rutinoside)	153-18-4
		Myricetin	529-44-2
		Delphinidin	528-53-0 (chloride)
		Cyanidin	528-58-5 (chloride)
	Anthocyanidins ^a	Petunidine	1429-30-7 (chloride)
		Peonidin	134-01-0 (chloride)
		Malvidin	643-84-5 (chloride)
	Anthocyanins ^b	Petunidin-3-O-glucoside	6988-81-4
			188 \pm 10

^a Concentrations determined by alkaline hydrolysis of the extract. The free anthocyanins were extracted from their corresponding sugar derivatives, except for malvidin (which was also determined in the non-hydrolyzed extract: $21 \pm 10 \mu\text{g/g}$).

^b The sugar-containing counterparts of anthocyanins.

extract volume of 100 mL. The sample was initially ground in a mortar with the selected dispersant (sand) at a ratio of 1:2, and anhydrous sodium sulphate was used as a drying agent. The sample was then loaded onto the column, and the elution solvent (Hank's balanced salt solution without glucose, mHBSS) was added. Layers of glass wool and sand were packed into the column at both ends of the extraction mixture; the lower layer acted as a filter and the upper layer prevented preferential channels for the extraction solvent. The total polyphenolic content of the blueberry HBSS extract (BBHE) was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method [33] and expressed as mg equivalents of gallic acid (GAE) per g of dry weight (dw). The individual polyphenols present in BBHE were then identified and quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS) following a previously described optimized method [31].

2.5. Quantitative biofilm assay

Biofilm formation was quantified following a previously described procedure [34], with some modifications. The Kp3380 strain was grown on LB broth overnight at 37°C with shaking. Overnight culture was 1:100 diluted in Mueller-Hinton (MH) medium and MH supplemented with BBHE and independently inoculated in polystyrene 48-well flat bottom microtitre plates (Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates). The plates were incubated at 37°C for 24 h under static conditions and biofilm formation was visualized by staining with 0.1 % crystal violet. Bacterial growth was measured at OD_{600} to estimate total cell biomass. Biofilm formation was quantified (OD_{580}) after solubilization with 30 % acetic acid. The amount of biofilm formed was determined as the $\text{OD}_{580}/\text{OD}_{600}$ ratio to prevent variations due to differences in bacterial growth. Six independent biological replicates were performed. The experimental data were analysed using a Student's *t*-test.

2.6. Bacterial adhesion to HT-29 human colorectal epithelial cells

The adhesive capacity of strain Kp3380 was determined following a previously described procedure [35], with some modifications. HT-29 human colorectal epithelial cells were grown at 37°C , in a 5 % CO_2 atmosphere, in McCoy's 5A Medium (Gibco) supplemented with 10 % FBS, 1 % P/S and 1 % Glutamax (Gibco). The cells were washed,

trypsinized and transferred to 24-well plates (Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates) to produce a monolayer of $\approx 10^5$ cells per well. The plates were incubated for 24 h at 37°C , and confluent monolayers were washed twice with saline solution and once with modified Hank's balanced salt solution (mHBSS). The cells were then infected with 10^5 bacteria per well and incubated for 3 h in mHBSS, mHBSS supplemented with BBHE and mHBSS supplemented with different polyphenols, including chlorogenic acid (100 $\mu\text{g/mL}$), caffeic acid (56 $\mu\text{g/mL}$), catechin (50 $\mu\text{g/mL}$), quercetin (52 $\mu\text{g/mL}$), malvidin (8.9 $\mu\text{g/mL}$), delphinidin (6.8 $\mu\text{g/mL}$) and cyanidin (1.5 $\mu\text{g/mL}$) at 37°C . The infected monolayers were washed three times with saline solution and lysed in 500 μL of 0.5 % sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich). Dilutions of the lysates were plated onto LB agar and incubated at 37°C for 24 h. The numbers of colony-forming units were counted 24 h later, and the percentage of bacteria that attached to HT-29 cells was calculated. The percentage of attached bacteria was compared with the total number of infecting bacteria. Four independent biological replicates were performed. The experimental data were analysed using a Student's *t*-test.

2.7. Scanning electron microscope analysis

Confluent monolayers of HT-29 cells were obtained and infected as described above. Polystyrene coverslips were placed on the bottom of the 24-well plates for scanning electron microscopy (SEM) analysis of bacterial attachment. Coverslips were removed, washed, fixed in 4 % formaldehyde-HBSS, dehydrated in ethanol, processed with a critical point drier and sputter coated, as previously described [36]. Bacterial attachment to HT-29 cells was viewed in a Jeol JSM-7200 F scanning electron microscope.

2.8. Murine intestinal colonization model

The ability of BBHE to target Kp3380 *in vivo* was assessed using a murine intestinal colonization model, as previously described [37], with some modifications. BALB/c mice were randomly distributed in cages, with one mouse per cage. Mice were previously treated with a single dose of streptomycin (1 g/Kg in 100 μL water by oral gavage) for decolonization of the GI tract. Two groups of seven mice were inoculated with the Kp3380 strain by an oral gavage of ca. 2×10^6 CFU/mouse in

100 μ L of PBS. After 24 h, faecal samples (0.2 g) were collected from the mice, and the bacterial burden was determined to confirm intestinal colonization with the strain of interest. Three days after inoculation, one group of mice ($n = 7$) was treated with an oral dose of BBHE (1 g/kg in 100 μ L water by oral gavage) every 12 h for 3 days. Mice in the untreated group ($n = 7$) were inoculated with 100 μ L of PBS. The mice were then euthanized, and intestinal segments (caecum and colon) were processed under aseptic conditions. Intestinal segments were weighed before homogenization and plated on LB supplemented with kanamycin (50 mg/mL) to determine the bacterial burden in the tissues. The experimental data were analysed using a Mann-Whitney test.

2.9. Ethics

Animal experiments were carried out with the approval of, and in accordance with, regulatory guidelines and standards established by the Animal Ethics Committee of the A Coruña University Hospital Complex (project code P82). This committee follows the recommendations of the National Committee for the Replacement, Refinement and Reduction of Animal Research.

2.10. Data availability

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and/or its supplementary materials.

3. Results and discussion

3.1. Polyphenol content of BBHE

The polyphenolic content of blueberry extracts varies depending on the extraction technique and solvents used. Plant phenolics are chemical compounds with a wide range of polarities, and combinations of water and organic solvents are usually used to modulate the final polarity of the extraction mixture in order to maximize extraction of polyphenols from the initial raw material. However, the use of organic solvents was not possible in the present study, because solvents would interfere with the microbiological experiments and also because the final intended application of the extract is as an easily deliverable medicament compatible with human life. In this context, although water might seem the best choice of extractant, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), a well-known buffer in growth media for some bacteria, enables more effective extraction of the bioactive polyphenols while producing extracts ready for bacterial testing. The total polyphenolic content of BBHE was 7.19 mg GAE/ g dw. The individual polyphenolic profile based on LC-MS/MS data of the extract obtained was characterized (Table 1). The main BBHE polyphenols are chlorogenic acid (343 μ g/g), isoquercetin (214 μ g/g), petunidin-3-O-glucoside (188 μ g/g), procyanidine C1 (124 μ g/g) and malvidin plus its sugar-derivatives (98 μ g/g).

The BBHE contained representatives of some of the main families of polyphenols. This is interesting because it indicates that the aqueous solvent (mHBSS) is capable of extracting the most polar polyphenols (mostly non-flavonoids), intermediate polarity compounds (flavan-3-ols) and low polarity compounds (in relative terms), such as flavonols and anthocyanins. Procyanidins are proanthocyanidins built from flavan-3-ols (+)-catechin and (–)-epicatechin and cover a variety of polarities due to their diversity and structural complexity. Procyanidins are categorized into A-type and B-type depending on the stereo configuration and linkage between monomers [38], with B-type procyanidins (B1, B2, and C1 in BE) being the most polar, followed by the C- and A-procyanidins.

Although the extraction mixture did not include organic solvents, almost the entire range of polarities was covered. This is because polyphenols are released more easily in a saline environment than in pure water, as the ionic strength is greater. This was confirmed in an

additional experiment, in which water and mHBSS were used in comparative extractions, and chlorogenic acid, glycosylated quercetins and total anthocyanins were quantified as markers. The concentration of chlorogenic acid was three times higher when mHBSS was used as the extraction solvent than when water was used, and the corresponding concentration was about two times higher in the other two groups of compounds.

The bioactivity of berry polyphenols and berry extracts rich in different groups of compounds has been investigated in numerous studies. Most attention has focused on the antimicrobial and anti-adhesive activity against uropathogens, particularly P-fimbriated *E. coli* strains. Indeed, cranberry consumption has long been associated with prevention of urinary tract infections (UTIs). Although several mechanisms of action have been demonstrated [39], the therapeutic effect has not yet been attributed to any individual polyphenolic compound. It is also interesting to note that, although it has been demonstrated that the antibacterial activity of these extracts is often dose-dependent, there is not necessarily a direct relationship between the concentration of a particular polyphenolic compound in the extract and its efficacy.

3.2. Anti-adhesion activity of BBHE in vitro

Cranberry products are widely used for prophylaxis of UTIs, on the basis of an anti-adhesive effect, which prevents attachment of bacteria to host tissues. Many plant-based products are known to have properties that prevent adhesion of clinical pathogens [28,29], and compounds that are capable of preventing and/or treating bacterial adhesion to surfaces are desirable as antibacterial agents. We investigated the effect of BBHE on adherence of Kp3380 to both biotic and abiotic surfaces. A crystal violet assay was used to quantify biofilm production and thus attachment of Kp3380 to abiotic surfaces. We observed that BBHE had a pronounced effect on bacterial adherence, with a concentration-dependent reduction in the subsequent biofilm production (Fig. 1A). None of the concentrations used affected bacterial growth. These findings are consistent with those of previous in vitro studies that reported the effects of cranberry and blueberry polyphenols on biofilm formation by *P. aeruginosa* and *E. coli* [40,41]. Cranberry-derived oligosaccharides, alone and in combination with phenolic compounds, have also been shown to reduce biofilm formation in *E. coli* [42]. The interaction between Kp3380 and colorectal cells in the presence of BBHE was also examined in this study. The findings revealed that significantly fewer bacteria attached to HT-29 colorectal cells when BBHE was added to the culture. This effect was also concentration-dependent, as shown in Fig. 1B. Similar results were reported for *Salmonella typhimurium*, in a study in which two different berry extracts (blueberry and blackberry) caused a reduction in adherence to intestinal INT407 cells [43]. Reduction of adherence to HT-29 cells by a high molecular weight molecule present in cranberries (NDM) was demonstrated in *Helicobacter pylori*, with the effect also being concentration-dependent [24]. Existing data suggest that a multi-component extract containing most of the original polyphenols will be a better antimicrobial than a single-component extract [10,14]. This can be explained by the synergistic interactions between the different plant polyphenols, as the mechanisms of antibacterial action are diverse and the plant synthesizes various compounds to attack its potential enemies and/or to react in stressful situations [10]. Indeed, it has recently been reported that the anti-adhesive effect of cranberry extract against *E. coli* cannot be attributed to a single compound [44]. As suggested in the present study, the strength of the extract is probably derived from the synergistic action of several polyphenols such as (in the case of BBHE) flavonoid glycosides (particularly quercetin and myricetin glycosides), anthocyanidins, A- and B-type PACs, and benzoic and hydroxycinnamic acid derivatives.

To explore this hypothesis, we selected different polyphenols for study on the basis of their abundance in BBHE. Thus, we examined the

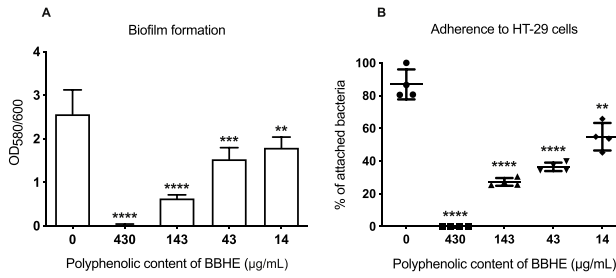


Fig. 1. Anti-adhesive activity of BBHE against *K. pneumoniae* Kp3380. A) Quantification of biofilm formation by crystal violet staining. Six independent biological replicates were analyzed. The values shown are means, and error bars indicate standard deviations. B) Quantification of the adherence of *K. pneumoniae* Kp3380 strain to HT-29 intestinal colorectal cells. Bacterial adherence is reported as the percentage of attached bacteria relative to the number of bacteria used to infect the eukaryotic cells (assumed to be 100 %). The data represent 4 independent biological replicates. The experimental data were analysed using a Student's *t*-test. Statistical significance is indicated, **** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ and ns when $P > 0.05$. The values shown are means, and error bars indicate standard deviations.

effect on adherence to HT-29 of three anthocyanidins (malvidin, delphinidin, and cyanidin), two hydroxycinnamic acids (chlorogenic and caffeic), one flavan-3 ol (catechin) and one flavonol (quercetin). All anthocyanins, along with caffeic acid, caused a reduction in the attachment of Kp3380 to colorectal cells (Fig. 2). The most active polyphenol was delphinidin, which reduced the number of attached bacteria by 90 %. However, neither catechin nor quercetin displayed anti-adhesive properties (Fig. 2). Attenuation of virulence factors and pathogenicity by the regulation of quorum sensing and inhibition of biofilm formation of chlorogenic acid, the most abundant compound in BBHE, has recently been demonstrated in *P. aeruginosa* [45]. However, we did not observe any effect of chlorogenic acid on bacterial attachment to intestinal cells (Fig. 2). The unfractionated berry extract was more active than any of the individual polyphenols alone. Although the concentration of the individual polyphenols is significantly lower in the

multi-component extract, the BBHE was more active due to the synergistic interactions between the different polyphenols. The presence of oligosaccharides in the berry extract probably contribute positively to its anti-adhesive properties, as they were found to be involved in reducing the adhesion of different pathogens to eukaryotic cells [21,22]. As attachment of Kp3380 to HT-29 colorectal cells is reduced in the presence of BBHE, we wondered whether bacterial or eukaryotic cell surfaces would be affected. SEM images of the colorectal cells infected with Kp3380 were taken in the presence and absence of BBHE (Fig. 3). The results confirmed our previous results and showed that fewer bacteria attached to eukaryotic cells in the presence of BBHE (Fig. 3, micrographs A and D). We also observed that the *K. pneumoniae* Kp3380 strain tends to form aggregates on the surface of intestinal cells (Fig. 3, micrograph B). However, we did not observe multicellular bacterial aggregates when HT-29 cells were infected in the presence of BBHE (Fig. 3, micrograph E). Thus, as well as preventing the attachment of bacteria to host tissues, BBHE could also facilitate elimination as the bacteria from the host, as aggregates of bacteria are more resistant to stressful conditions, such as exposure to antimicrobial treatments. In addition, while no significant changes were observed in bacterial morphology, the surface of the eukaryotic cells differed considerably when incubated in the presence of BBHE (Fig. 3). Although further experimentation is required to clarify how BBHE affects the eukaryotic cellular surface, the SEM images indicate that the anti-adhesive effect of the extract may be stronger in intestinal cells.

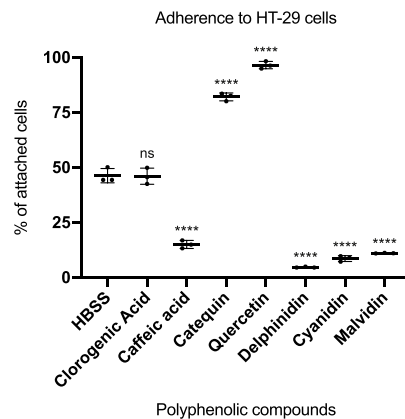


Fig. 2. Anti-adhesive activity of polyphenolic compounds derived from blueberry extract against *K. pneumoniae* Kp3380. Quantification of the adherence of *K. pneumoniae* Kp3380 strain to HT-29 intestinal colorectal cells. Polyphenolic compounds used: chlorogenic acid (100 µg/mL), caffeic acid (56 µg/mL), catechin (50 µg/mL), quercetin (52 µg/mL), malvidin (8.9 µg/mL), delphinidin (6.8 µg/mL) and cyanidin (1.5 µg/mL). Bacterial adherence is reported as the percentage of attached bacteria relative to the number of bacteria used to infect the eukaryotic cells (assumed to be 100 %). The data are average values from 4 independent biological replicates. The experimental data were analysed using a Student's *t*-test. Statistical significance is indicated, **** $P \leq 0.0001$, and ns when $P > 0.05$. The values shown are means, and error bars indicate standard deviations.

3.3. Effect of a BBHE-based decolonization treatment

Considering the in vitro anti-adhesive properties of the BBHE, we decided to investigate the performance of the extract as a decolonization treatment in an in vivo murine model. GI tract colonization is probably a common and significant reservoir of *K. pneumoniae* for dissemination and an important step in progression to infection [5,46]. Thus, establishing efficient intervention protocols to prevent colonization and subsequent infection would be of great value.

Mice pretreated with streptomycin were intestinally colonized with the Kp3380 strain. This strain has been spreading rapidly and has caused a large outbreak in Spain, showing a remarkable adherent phenotype and colonization capacity [32]. Several decolonization interventions were administered to the patients to eradicate the pathogen from the intestine (e.g. probiotics and oral colistin and gentamycin therapy), but all strategies failed. Treatment of mice colonized by Kp3380 with 6 doses (administered by oral gavage) of BBHE every 12 h, significantly reduced Kp3380 levels in the cecum and colon relative to mice treated with a vehicle control (Fig. 4). These results are consistent with those of a previous study of intestinal colonization with *S. typhimurium* in chicks treated with a combined extract of blackberry and blueberry, in which cecum colonization was reduced [43]. Similarly, a model in pigs infected with *E. coli* showed that the administration of food and water

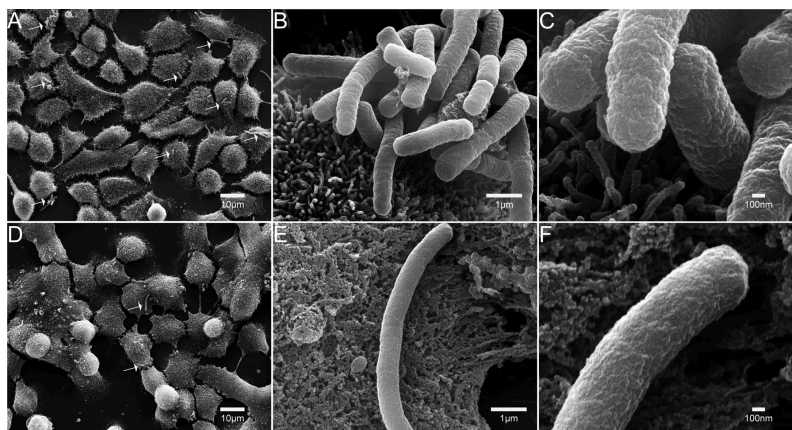


Fig. 3. SEM images of the colorectal cells infected with *Klebsiella pneumoniae* Kp3380. Microscopic observations of bacterial and eukaryotic cells were made in the presence (lower panel) and absence (upper panel) of BBHE. Micrographs were taken at 1,000x (micrographs A and D), 15,000x (micrographs B and E), and 50,000x (micrographs C and F) magnification. Bars indicate the scale.

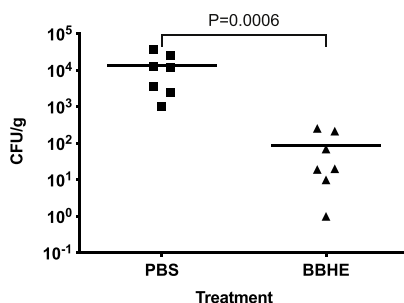


Fig. 4. Effect of BBHE on *K. pneumoniae* intestinal colonization. BALB/c mice were intestinally colonized with Kp3380 and administered 6 oral doses of BBHE (1 g/kg) or vehicle alone (PBS, Control). Intestinal colonization of mice with Kp3380 was achieved by oral gavage with $\sim 10^6$ bacteria. The bacterial burden in intestinal segments (caecum and colon) was determined 6 days post inoculation. Any significant differences between the two groups (mean values) were determined using a Mann-Whitney test. The statistical significance is indicated ($P = 0.0006$).

supplemented with cranberry extract significantly reduced the establishment of infection [47].

4. Conclusions

The spread of clinically important *K. pneumoniae* clones has contributed to the global emergence of antibiotic resistance. The high incidence of *K. pneumoniae* infections is associated with the ability of this pathogen to colonize the GI tract, which promotes dissemination and is linked to subsequent infection. Thus, efficient intervention protocols to prevent colonization are needed. We obtained and characterized an anthocyanin-rich blueberry extract, BBHE, with in vitro and in vivo anti-adhesive properties. We demonstrated that this extract prevents attachment of a highly adherent *K. pneumoniae* strain to abiotic and

biotic surfaces in a dose-dependent manner. In addition, the anti-adhesive properties of the BBHE were also observed in vivo, demonstrating the potential usefulness of the extract as a decolonization treatment in a murine model.

Few studies have been performed on the use of berry extracts as a decolonization treatment or as an adjuvant to existing treatments, and the findings of the present study may therefore lead to the design of new therapeutic strategies.

Funding

This research was supported by projects p-01216A and IJCI-2016-29524 (awarded to AP), funded by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO), respectively. Further support was provided by Projects PI15/00860 and PI18/00501 (awarded to GB), funded by the Instituto de Salud Carlos III (Co-funded by European Regional Development Fund "A way to make Europe") and Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/006). EG was financially supported by SEIMC project and AP was financially supported by the Juan de la Cierva program (MINECO, IJCI-2016-29524).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Department of Microbiology in the University Hospital of A Coruña (CHUAC) for kindly providing the clinical strain used in this study. We also thank the i-Grape laboratory, a "spin off" company from the University of Santiago de Compostela, for kindly providing the blueberry extract used in this study.

References

- [1] J.N. Pendleton, S.P. Gorman, B.F. Gilmore, Clinical relevance of the ESKAPE pathogens, *Expert Rev. Anti. Ther.* 11 (2013) 297–308, <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.
- [2] C. Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019, 2019.
- [3] J. Sánchez-López, R. Cantón, Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: epidemiology and resistance phenotypes, *Rev. Española Quimioter. Publicación Soc. Española Quimioter.* 32 (2019) 27–31.
- [4] S. Navon-Venezia, K. Kondratyeva, A. Garattoli, *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance, *FEMS Microbiol. Rev.* (2013), <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>.
- [5] R.M. Martin, M.A. Bachman, Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>.
- [6] K. Kontopoulou, E. Iosifidis, E. Antoniadou, P. Tasioudis, E. Petinaki, E. Malli, S. Metallidis, A. Vatopoulos, N. Malisiovas, The clinical significance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* rectal colonization in critically ill patients: from colonization to bloodstream infection, *J. Med. Microbiol.* 68 (2019) 326–335, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000921>.
- [7] C.I. Gorrie, M. Miret-Era, R.R. Wick, D.J. Edwards, N.R. Thomson, R.A. Strugnell, N. F. Pratt, J.S. Garlick, K.M. Watson, D.V. Pilcher, S.A. McGoughlin, D.W. Spelman, A.W.J. Jenney, K.E. Holt, Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients, *Clin. Infect. Dis.* 65 (2017) 208–215, <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>.
- [8] K. Gupta, M.Y. Chou, A. Howell, C. Wobbe, R. Grady, A.E. Stapleton, Cranberry products inhibit adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells, *J. Urol.* 177 (2007) 2357–2360, <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.01.114>.
- [9] A.B. Howell, H. Botto, C. Combescure, A.B. Blanc-Potard, L. Gausa, T. Matsumoto, P. Tenke, A. Sotto, J.P. Lavigne, Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double-blind study, *BMC Infect. Dis.* 10 (2010), <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-94>.
- [10] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angew. Chem. - Int. Ed.* 50 (2011) 586–621, <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>.
- [11] B. Özgelik, M. Kartal, I. Orhan, Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids, *Pharm. Biol.* 49 (2011) 396–402, <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.519390>.
- [12] J.-L.R. Rama, N. Mallo, M. Biddau, F. Fernandes, T. de Miguel, L. Sheiner, A. Choupina, M. Lores, Exploring the powerful phytoarsenal of white grape marc against bacteria and parasites causing significant diseases, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07472-1>.
- [13] S. Skovrankova, D. Sumczynski, J. Mleek, T. Jurikova, J. Sochor, Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 24673–24706, <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>.
- [14] R. Puupponen-Piimä, L. Nohynek, H.L. Alakomi, K.M. Oksman-Caldentey, Bioactive berry compounds - Novel tools against human pathogens, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 8–18, <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1817-x>.
- [15] D. Burdulis, A. Šarkinas, I. Jasutienė, E. Stackevičienė, L. Nikolajevs, V. Janulis, Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits, *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 66 (2009) 399–408.
- [16] A. Lacombe, V.C.H. Wu, J. White, S. Tadeipalli, E.E. Andre, The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, *Food Microbiol.* 30 (2012) 124–131, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.006>.
- [17] V.C.H. Wu, X. Qiu, A. Bushway, L. Harper, Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens, *LWT - Food Sci. Technol.* 41 (2008) 1834–1841, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.001>.
- [18] A.B. Howell, N. Vorsa, A.D. Marderosian, L.Y. Foo, Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1085–1086, <https://doi.org/10.1056/NEJM199810083391516>.
- [19] A.B. Howell, J.D. Reed, C.G. Krueger, R. Winterbottom, D.G. Cunningham, M. Leahy, A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity, *Phytochemistry*. 66 (2005) 2281–2291, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.022>.
- [20] C.M. Coleman, K.M. Auken, K.B. Killday, P. Azadi, I. Black, D. Ferreira, Arabinosyloglucan oligosaccharides may contribute to the antiadhesive properties of porcine urine after cranberry consumption, *J. Nat. Prod.* 82 (2019) 589–605, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01043>.
- [21] A. Ramirez-Hernandez, J. Rupnow, R.W. Hutkins, Adherence reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to HEp-2 cells by mannan oligosaccharides and a high-molecular-weight component of cranberry extract, *J. Food Prot.* 78 (2015) 1496–1505, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-087>.
- [22] A.T. Hotchkiss, A. Nuñez, G.D. Strahan, H.K. Chau, A.K. White, J.P.J. Marais, K. Hom, M.S. Vakkalanka, R. Di, K.L. Yam, C. Khoo, Cranberry xyloglucan structure and inhibition of *Escherichia coli* adhesion to epithelial cells, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 5622–5633, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00730>.
- [23] R.P. Feliciano, J.J. Meudt, D. Shanmuganayagam, C.G. Krueger, J.D. Reed, Ratio of “A-type” to “B-type” proanthocyanidin interflavan bonds affects extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* invasion of gut epithelial cells, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 3919–3925, <https://doi.org/10.1021/jf403839a>.
- [24] O. Burger, E. Weiss, N. Sharon, M. Tabak, I. Neeman, I. Ofek, Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42 (2002) 279–284, <https://doi.org/10.1080/10408390209351916>.
- [25] J.E. Frampto, Crofelemer: a review of its use in the management of non-infectious diarrhoea in adult patients with HIV/AIDS on antiretroviral therapy, *Drugs*. 73 (2013) 1121–1129, <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0083-6>.
- [26] M.C. Denis, Y. Desjardins, A. Furtos, V. Marcl, S. Dudonné, A. Montoudis, C. Garofalo, E. Delvin, A. Marette, E. Levy, Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 128 (2015) 197–212, <https://doi.org/10.1042/CS20140210>.
- [27] F.F. Anhê, D. Roy, G. Pilon, S. Dudonné, S. Matamoros, T.V. Varin, C. Garofalo, Q. Moine, Y. Desjardins, E. Levy, A. Marette, A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice, *Gut* 64 (2015) 872–883, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307142>.
- [28] A.B. Howell, Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 732–737, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700038>.
- [29] D.G. De Llano, A. Esteban-Fernández, F. Sánchez-Patán, P.J. Martín-Álvarez, M. V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé, Anti-adhesive activity of cranberry phenolic compounds and their microbial-derived metabolites against uropathogenic *Escherichia coli* in bladder epithelial cell cultures, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 12119–12130, <https://doi.org/10.3390/ijms160612119>.
- [30] M. Lores Aguin, Marta García-Jares, Carmen Álvarez Casas, Marta Llompart, POLYPHENOL Extract from WHITE-GRAPE Residue, *WO/2014/013122 A.1.* 2014.
- [31] M. Lores, M. Pajaro, M. Álvarez-Casas, J. Domínguez, C. García-Jares, Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems, *Talanta*. 140 (2015) 134–142, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.034>.
- [32] E. Gato, J.C. Vázquez-Ucha, S. Rumbo-Feal, L. Álvarez-Fraga, J.A. Vallejo, M. Martínez-Gutián, A. Beceiro, J. Ramos Vivas, P.J. Sola Campoy, M. Pérez-Vázquez, J. Otero Iglesias, B.K. Rodino-Janeiro, A. Romero, M. Poza, G. Bou, A. Pérez, Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117 (2020) 17249–17259, <https://doi.org/10.1073/pnas.1921393117>.
- [33] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144.
- [34] S. Rumbo-Feal, A. Pérez, T.A. Ramelot, L. Álvarez-Fraga, J.A. Vallejo, A. Beceiro, E. J. Ohneck, B.A. Arivett, M. Merino, S.E. Fiester, M.A. Kennedy, L.A. Actis, G. Bou, M. Poza, Contribution of the *A. baumannii* A1S,0114 gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00108>.
- [35] L. Álvarez-Fraga, A. Pérez, S. Rumbo-Feal, M. Merino, J.A. Vallejo, E.J. Ohneck, R. E. Edelmann, A. Beceiro, J.C. Vázquez-Ucha, J. Valle, L.A. Actis, G. Bou, M. Poza, Analysis of the role of the LHP92.11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells, *Virulence* 7 (2016) 443–455, <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335>.
- [36] A.P. Tomaras, C.W. Dorsey, R.E. Edelmann, L.A. Actis, Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system, *Microbiology* 149 (2003) 3473–3484, <https://doi.org/10.1099/mic.0.26541-0>.
- [37] C.N. Spaulding, R.D. Klein, S. Ruer, A.L. Kau, H.L. Schreiber, Z.T. Cusumano, K. W. Dodson, J.S. Pinkner, D.H. Fremont, J.W. Janetka, H. Remaut, J.J. Gordon, S. J. Hultgren, Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist, *Nature* 546 (2017) 528–532, <https://doi.org/10.1038/nature22972>.
- [38] E.A. Rue, M.D. Rush, R.B. van Breemen, Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry, *Phytochem. Rev.* 17 (2018) 1–16, <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9507-3>.
- [39] C. Papuc, G.V. Goran, C.N. Predescu, V. Nicorescu, G. Stefan, Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: classification, structures, sources, and action mechanisms, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16 (2017) 1243–1268, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12298>.
- [40] R.K. Ulrey, S.M. Barksdale, W. Zhou, M.L. Van Hoek, Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Complement. Altern. Med.* 14 (2014), <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-499>.
- [41] C. Rodríguez-Pérez, R. Quirantes-Piné, J. Uberos, C. Jiménez-Sánchez, A. Peña, A. Segura-Carretero, Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*, *Food Funct.* 7 (2016) 1564–1573, <https://doi.org/10.1039/c5fo01441g>.
- [42] J. Sun, J.P.J. Marais, C. Khoo, K. LaPlante, R.M. Vejborg, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, N.P. Seeram, D.C. Rowley, Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*, *J. Funct. Foods* 17 (2015) 235–242, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.016>.
- [43] S. Salaaheen, E. Jaiswal, J. Joo, M. Peng, R. Ho, D. O'Connor, K. Adler, J.H. Aranda-Espinoza, D. Biswas, Bioactive extracts from berry byproducts on the pathogenicity

- of *Salmonella typhimurium*, Int. J. Food Microbiol. 237 (2016) 128–135, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2016.08.027>.
- [44] B. Scharf, T.J. Schmidt, S. Rabbani, C. Stork, U. Dobrindt, J. Sendker, B. Ernst, A. Hensel, Antiadhesive natural products against uropathogenic *E. coli*: what can we learn from cranberry extract? J. Ethnopharmacol. 257 (2020) 112889, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112889>.
- [45] H. Wang, W. Chu, C. Ye, B. Gaeta, H. Tao, M. Wang, Z. Qiu, Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by regulating quorum sensing, Appl. Microbiol. Biotechnol. 103 (2019) 903–915, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9482-7>.
- [46] R.M. Martin, J. Cao, S. Brisse, V. Passet, W. Wu, L. Zhao, P.N. Malani, K. Rao, M. A. Bachman, Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*, MSphere. 1 (2016), <https://doi.org/10.1128/msphere.00261-16>.
- [47] A. Coddens, M. Loos, D. Vanrompey, J.P. Remon, E. Cox, Cranberry extract inhibits in vitro adhesion of F4 and F18 + *Escherichia coli* to pig intestinal epithelium and reduces in vivo excretion of pigs orally challenged with F18 + verotoxigenic *E. coli*, Vet. Microbiol. 202 (2017) 64–71, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.019>.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

Las enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos, especialmente *K. pneumoniae*, representan un serio desafío a nivel mundial, ya que hay pocas opciones terapéuticas disponibles. Este patógeno tiene un alto potencial para causar brotes en entornos sanitarios. Se han notificado brotes causados por *K. pneumoniae* productora de OXA-48 en distintos países europeos, siendo Rumanía, España y Turquía algunos de los países europeos con mayor incidencia (27). El éxito de este patógeno se ve favorecido por su capacidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos y para propagarse y persistir tanto en el medio ambiente como en los seres humanos.

La diseminación de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas se asocia con el éxito de ciertos clones de alto riesgo, como el ST11, ST15, ST101 o ST258/512 altamente prevalentes en Europa (27,426). Aunque las carbapenemasas de tipo KPC son las más ampliamente distribuidas, la prevalencia de las enzimas del tipo OXA-48 ha aumentado significativamente desde que se describieron por primera vez en 2001 (196). Actualmente, esta enzima se encuentra entre las detectadas con mayor frecuencia en la familia *Enterobacteriaceae* (427). La carbapenemasa OXA-48 suele ser transportada por plásmidos IncL (428). Este plásmido epidémico se ha asociado previamente con STs específicos de *K. pneumoniae*, entre los que se encuentra el ST15. Estos clones poseen una capacidad superior para causar brotes y una mayor diseminación a nivel global. Se ha demostrado que la transferencia de plásmidos portadores de OXA-48 se produce dentro de los pacientes entre distintas especies de enterobacterias, lo que promueve la colonización a largo plazo con bacterias resistentes a los carbapenémicos. Este mismo estudio también reveló que *K. pneumoniae* fue la especie bacteriana más frecuentemente diseminada entre los pacientes.

En este trabajo identificamos un gran brote de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 en el Hospital Universitario de A Coruña donde el clon predominante pertenecía al HRC ST15. Este brote surgió en el hospital en febrero de 2013, afectando inicialmente a 23 pacientes. Esta cepa de *K. pneumoniae* MDR se encontró en muchas de las salas del hospital y se diseminó rápidamente a la comunidad. El clon epidémico ST15 fue capaz de persistir durante más de 6 años en el ambiente hospitalario y finalmente dio lugar a una situación endémica en el área sanitaria, a pesar de las estrictas medidas de control aplicadas. Un total de 682 pacientes fueron infectados y/o colonizados por este clon epidémico, de los cuales 427 lo adquirieron durante su estancia en el hospital. Estos datos concuerdan con las evidencias recientes que señalan a las instituciones sanitarias como importantes focos de propagación de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasas (27).

El alto porcentaje de pacientes colonizados con este clon epidémico (93.3%) pudo favorecer su persistencia y explicar la progresión del brote. Se prescribieron varios tratamientos de descolonización destinados a erradicar el microorganismo de la flora intestinal de los pacientes, como probióticos o el uso de antibióticos como la colistina y la gentamicina, por vía oral. Sin embargo, todas estas estrategias fracasaron, lo que pone de manifiesto el desafío que supone el control de la diseminación de este tipo de clones epidémicos. Entender las características que hacen que estos clones sean tan exitosos y estén tan diseminados es esencial para el desarrollo de medidas de prevención y tratamiento (91). La resistencia a los antimicrobianos y la virulencia son los principales factores que favorecen el éxito de estos HRC. En este contexto, identificar los rasgos genómicos que aumentan la transmisibilidad, la patogenicidad y la resistencia a los antibióticos de este clon puede ser crucial para su detección temprana y para aplicar medidas de control eficaces con el objetivo de evitar una

mayor propagación. En todos estos puntos se ha centrado esta Tesis Doctoral, aportando un poco más de conocimiento sobre las características genotípicas y fenotípicas del clon ST15 de *K. pneumoniae* y proporcionando nuevas alternativas para su detección y control.

Utilizamos, como modelo de estudio un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* ST15 denominado Kp3380. Esta cepa bacteriana fue aislada durante el brote detectado en el Hospital Universitario de A Coruña y ha sido utilizado durante el desarrollo de esta estudio para identificar los mecanismos relacionados con la patogenicidad del clon ST15 de *K. pneumoniae*. Esta cepa tiene un fenotipo altamente adherente en comparación con otras aisladas durante brotes ocurridos en otros hospitales de España pertenecientes a otros STs diferentes. Mediante microscopía electrónica se observó una relación entre la presencia de abundantes pili en la superficie de la cepa Kp3380 y su fenotipo adherente. Este estudio se diseñó en base a la hipótesis de que la combinación de determinadas características genéticas implicadas en la patogénesis bacteriana y la presencia de plásmidos portadores de genes de resistencia a los antibióticos podrían explicar el éxito del clon ST15 y su comportamiento clínico y epidemiológico. Para ello, llevamos a cabo dos análisis genómicos comparativos.

Uno de los análisis genómicos comparativos se realizó entre la cepa Kp3380, las cepas Kp09107, Kp924, Kp727 y Kp1278 aisladas durante otros brotes hospitalarios en España, y las cepas de referencia MGH78578 y ATCC10031. Este primer análisis nos permitió identificar un nuevo sistema CUP, al que denominamos Kpi. Este sistema estaba presente en la cepa Kp3380 mientras que, en las otras cepas analizadas estaba ausente o funcionalmente afectado. Por lo tanto, nuestra hipótesis fue que este sistema podría tener un papel relevante en el fenotipo adherente observado en Kp3380. Se observó que las proteínas codificadas por el operón *kpiABCDEFGG*

tienen una estructura similar a la del sistema CUP tipo *fim*, con la excepción de KpiA, que no está relacionada estructuralmente con ninguna proteína cristalizada. Sin embargo, el sistema Kpi no comparte la misma organización genética. A diferencia del sistema Fim, Kpi pertenece al clado fimbrial $\gamma 2$, en gran medida desconocido. Al igual que el sistema Kpi, los operones pertenecientes a las fimbrias $\gamma 2$ tienen 3 genes chaperonas (369) y comparten una organización génica similar. El análisis funcional y genético comparativo entre Kpi y el sistema Fas (el miembro mejor estudiado de las fimbrias $\gamma 2$ de *E. coli*)(369), reveló que estos sistemas comparten características comunes. La proteína fimbrial KpiD es posiblemente la subunidad principal. La proteína KpiA es similar a la proteína FasG al analizar los motivos funcionales, por lo que se planteó la hipótesis de que esta proteína podría ser la adhesina de la punta. Sin embargo, KpiA es más corta que FasG y no está relacionada estructuralmente con ninguna proteína cristalizada, por lo que se necesitan análisis adicionales para dilucidar la función de esta proteína. A diferencia del sistema Fas, las 3 chaperonas del sistema Kpi contienen los dos dominios chaperona: PFAM00345 y PFAM02753. Aunque Kpi está filogenéticamente relacionada con el sistema Fas, está todavía más relacionada con el miembro no caracterizado plu0268 de *Photorhabdus luminescens* (369). Varios estudios previos han demostrado que varios sistemas CUP, incluidas las fimbrias de tipo 1 y 3 (34,374,375), participan en la adherencia en *K. pneumoniae*, por lo que nos preguntamos si la habilidad de Kp3380 para formar *biofilm* y adherirse a células eucariotas se debía a la presencia del sistema Kpi.

Aunque el sistema Kpi está estructuralmente relacionado con el sistema CUP de tipo 1, desempeña un papel en la interacción de Kp3380 con superficies tanto abióticas como bióticas. Al igual que sus homólogas Fim (88) y Kpg (374), Kpi es necesaria para la adhesión a las superficies epiteliales. Sin embargo, a diferencia de

las fimbrias Fim, se ha demostrado que el sistema Kpi es necesario para la adhesión de Kp3380 a diferentes tipos de células epiteliales, como las células intestinales HT-29, las células alveolares A549 y las células vesicales HT-1376. Del mismo modo, se ha demostrado que la capacidad de la cepa Kp3380 para formar *biofilm* se reduce cuando se inactiva la proteína KpiD. Se ha descrito el papel de varios sistemas CUP en la formación de *biofilm*, destacando el papel de las fimbrias de tipo 3 (*mrk*) como fuerte promotor de *biofilm* (60,384,389,392,429). Las fimbrias de tipo 1 (*fim*), junto con las fimbrias de tipo 3 (*mrk*), participan en la formación de *biofilm* en las sondas del tracto uretral (60,384,389,392,430). Se han identificado hasta 8 pili de tipo *usher* en la cepa LM21 de *K. pneumoniae*, entre los que Kpa, Kpg y Mrk también desempeñan un papel en la formación de *biofilm* (374). Asimismo, se ha demostrado que las fimbrias Kpc están implicadas en la capacidad de formación de *biofilm* de la cepa *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (375).

Teniendo en cuenta que el sistema CUP Kpi está implicado en la adherencia a las células intestinales y que el primer paso en la mayoría de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* es la colonización del tracto gastrointestinal del paciente, utilizamos un modelo animal *in vivo* para investigar el papel de Kpi en la colonización intestinal.

La implicación de varios tipos de fimbrias en la colonización intestinal se ha discutido en trabajos previos. El sistema Fas está implicado en la adherencia de *E. coli* a las células intestinales de los lechones (369). Además, se ha demostrado que otras estructuras adhesivas confieren adherencia a las células intestinales en *K. pneumoniae*, lo que sugiere que desempeñan un papel en la colonización del tracto gastrointestinal (399,431,432). Sin embargo, el papel de las fimbrias de tipo 1 y 3 en la colonización intestinal sigue siendo controvertido. Se ha descrito que ninguno de los dos tipos de

pili están implicados en la capacidad de *K. pneumoniae* para colonizar o infectar los pulmones (376,430,433). En contraste con los estudios anteriores, se ha demostrado que la colonización intestinal murina se ve afectada tanto en las cepas LM21 defectivas del operón *mrk* como en las cepas LM21 defectivas del operón *fim* (374). Recientemente se ha descrito de que la regulación negativa de las fimbrias de tipo 1 en *K. pneumoniae* NTUH-K2044, junto con la falta de sistemas de secreción de tipo VI, es importante para la colonización intestinal por parte de la bacteria (367).

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que la capacidad de colonización de la cepa Kp3380 defectiva del gen *kpiD* se redujo significativamente, lo que indica que esta cepa necesita este sistema para la colonizar el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la inactivación de Kpi no tiene ningún efecto en la virulencia de la cepa Kp3380 en un modelo de infección de neumonía murina aguda. Los diferentes resultados observados en estos dos modelos *in vivo* pueden deberse a las diferentes características que muestran ambos nichos del hospedador. Las bacterias utilizan estrategias distintas cuando interactúan con el hospedador, y los mecanismos moleculares utilizados por *K. pneumoniae* para colonizar el tracto gastrointestinal o para causar infecciones agudas como la neumonía pueden ser muy diferentes. Los factores de virulencia relacionados con la adherencia en *K. pneumoniae*, como el sistema Kpi, pueden desempeñar un papel crucial en la colonización, mientras que otros factores de virulencia pueden tener un papel más importante en los modelos de infección aguda. Dado que la colonización por *K. pneumoniae* está estrechamente relacionada con la infección posterior, nuestros hallazgos pueden ser importantes para comprender los mecanismos subyacentes de la progresión de la enfermedad. Las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de Kpi pueden tener una ventaja adaptativa que les permite persistir en los seres humanos y en el entorno hospitalario, favoreciendo así la

progresión del brote, a pesar de los intensos protocolos de intervención. De hecho, descubrimos que este nuevo sistema CUP está estrechamente asociado con el ST15, ampliamente diseminado y relacionado con brotes hospitalarios en todo el mundo (64,91). Por lo tanto, el sistema Kpi puede explicar, al menos en parte, la capacidad superior de este clon para diseminarse y causar brotes. Así, este sistema podría ser una buena diana para identificar este clon de alto riesgo y poder controlar con éxito su propagación.

Además, teniendo en cuenta que la capacidad de la cepa deficiente en Kpi para infectar y matar a *Galleria mellonella* se vio significativamente reducida, junto con su papel en la adherencia y la formación de *biofilm*, sugerimos que este sistema desempeña un papel en la virulencia de *K. pneumoniae* Kp3380. Es interesante señalar que, al contrario de lo que encontramos en los ensayos *in vitro*, la complementación del sistema Kpi basada en plásmidos no restauró el fenotipo de la cepa salvaje en los modelos *in vivo*, a pesar de que aproximadamente la mitad de las bacterias albergaban el plásmido de complementación. Una posible explicación de este hecho podría ser que las bacterias sin plásmidos se ven favorecidas frente a las bacterias portadoras de plásmidos debido al coste en términos de eficacia biológica asociado a la expresión de estos (434,435), especialmente en las condiciones de limitación del crecimiento que se dan en el hospedador. Este hecho, junto con la pérdida observada del plásmido de complementación, podría ser decisivo para que las bacterias portadoras del plásmido no puedan desarrollar la infección adecuadamente, lo que llevaría al fracaso de la complementación.

El otro análisis comparativo que se realizó en este trabajo se llevó a cabo entre los aislamientos bacterianos pertenecientes a los cinco STs diferentes de *K. pneumoniae* portadora de OXA-48 identificados en una muestra representativa del

brote del Hospital Universitario de A Coruña. Los cinco STs comparados fueron el ST15, el ST11, el ST147, el ST405 y el ST551. Se identificaron los determinantes genómicos que posee el ST15 y que no poseen el resto de STs. Estas características específicas del ST15 podrían proporcionarle la capacidad de desplazar al resto de clones durante la duración del brote. Observamos que el clon ST15 tenía un conjunto único de genes de virulencia y resistencia, siendo el único que albergaba un plásmido no móvil IncR que portaba las β -lactamasas OXA-1 y CTX-M-15, así como los genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas (*aac(6')-Ib-cr*) y al cloranfenicol (*catB3*). En general, estos genes de resistencia sólo se encontraron en el ST15, aunque la β -lactamasa CTX-M-15 también se encontró en los STs 405 y 147, localizada en un plásmido IncFII/IncFIB y en el cromosoma, respectivamente. Además, solamente el clon ST15 albergaba dos sistemas relacionados con la adherencia, el sistema Kpi y el sistema TPS FhaB/FhaC. Aunque el sistema Kpi también estaba presente en el ST405, el gen *kpiD*, que codifica la fimbria KpiD, tiene cambios nucleotídicos y deleciones que dan lugar a cambios en la secuencia proteica que se traducen en un producto truncado y no funcional.

En este trabajo hemos identificado por primera vez la presencia del sistema TPS FhaB/FhaC en *K. pneumoniae*. Este sistema TPS se ha asociado con el potencial patogénico de una cepa de *Acinetobacter baumannii* relacionada con un brote en el Hospital Universitario 12 de Octubre (342). Otros sistemas FHA relacionados, como el FHA de *Bordetella pertussis* (436), el HecA de *Erwinia chrysanthemi* (437) y el HMW1/2 de *Haemophilus influenzae* (438), también se han descrito como adhesinas que desempeñan un papel importante como factores de virulencia en estas especies (439). Nuestros hallazgos también demuestran que el sistema FhaB/FhaC promueve la formación de *biofilm* y la adhesión a células eucariotas intestinales en *K. pneumoniae*.

Al analizar los genomas de 1649 *K. pneumoniae* pertenecientes a la colección EuSCAPE observamos que el sistema FhaB/FhaC está más estrechamente asociado al clon ST15 que el sistema Kpi. Además, también hemos demostrado que los sistemas FhaB/FhaC y Kpi están implicados en el mantenimiento de la competitividad biológica del HRC *K. pneumoniae* ST15 *in vitro*. Esto sugiere que estos sistemas pueden proporcionar al ST15 una ventaja adaptativa con respecto a otros STs de *K. pneumoniae* que no albergan estos factores de patogenicidad. Estos mecanismos pueden ser beneficiosos para la dispersión epidémica entre pacientes, hospitales y diferentes entornos.

Debido a la alta capacidad de *K. pneumoniae* para causar brotes hospitalarios y propagarse por todo el mundo, una de las necesidades clínicas y de salud pública es el desarrollo de nuevas técnicas de detección molecular. Estas técnicas ayudarían a identificar y rastrear la diseminación del HRC ST15 y así, poder aplicar medidas de control de forma rápida y eficaz. Teniendo en cuenta que los dos sistemas descritos en esta Tesis, el Kpi y el FhaB/FhaC, están claramente asociados con el clon ST15 de *K. pneumoniae*, hemos propuesto una técnica de detección molecular rápida. Trabajos previos habían utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (***polymerase chain reaction*; PCR**) múltiple para la diferenciación entre las cepas cKp resistentes a los carbapenémicos y las hvKp (440) y para la detección de BLEEs en enterobacterias (441). Basándonos en el uso probado de estas técnicas, diseñamos una PCR múltiple basada en la detección de dos genes *kpiD* y *fhaC* pertenecientes a los sistemas Kpi y el FhaB/FhaC para la detección del HRC ST15 de *K. pneumoniae*. Esta técnica permitiría llevar a cabo su detección rápida y precoz. Para ello utilizamos 294 aislados de *K. pneumoniae* y obtuvimos una concordancia del 100% entre los datos obtenidos con la PCR múltiple y los datos genómicos y el MLST de las 294 cepas

testadas. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad de la técnica fueron del 100% y el 97,76%, respectivamente. En cuanto a los porcentajes de los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos fueron del 81,25% y el 100%. Además, basándonos en el 100% de concordancia de la PCR múltiple con los datos genómicos y el MLST, calculamos los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para la aplicación de esta técnica en una base de datos con un mayor número de aislamientos. Los datos obtenidos al utilizar, de forma predictiva, la base de datos EuSCAPE fueron todavía mejores, obteniendo un 100% de sensibilidad, un 99,4% de especificidad, un 94,16% de valores predictivos positivos y un 100% de valores predictivos negativos utilizando estos dos marcadores. Estos datos todavía podrían ser mejorados con estudios más exhaustivos basados en las comparaciones de los genomas accesorios de los distintos HRc, pudiendo, incluso, detectar los distintos HRc utilizando la misma PCR.

La gravedad, la prevalencia y la morbilidad asociada a las infecciones causadas por *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos ponen de manifiesto la urgente necesidad de encontrar nuevas estrategias para el manejo de las mismas. La colonización gastrointestinal es un reservorio común de *K. pneumoniae* y juega un papel importante en la transmisión y evolución de la infección en los pacientes (93,400,401). La dificultad para erradicar la colonización intestinal y la inexistencia, por el momento, de protocolos de descolonización aceptados de forma universal para las enterobacterias MDR, crea la necesidad de optimizar las estrategias existentes y/o el desarrollar nuevas estrategias de descolonización.

Numerosos estudios han sido publicados mostrando el efecto de los extractos del arándano rojo y sus componentes en la inhibición de la adherencia de *E. coli* a las células uroepiteliales, e incluso, en estudios más recientes, se observa una reducción

de la expresión de diez genes que codifican β -lactamasas y genes de virulencia después de un tratamiento con Cysticlean® (Vitagreen), un producto comercial de extracto de arándano Americano liofilizado (442–444). Además, se han realizado varios ensayos clínicos para analizar la eficacia de los extractos de arándano en infecciones de orina, observándose una clara reducción de la adherencia bacteriana e indicando su posible uso como profiláctico (445,446).

En esta Tesis Doctoral obtuvimos un extracto de arándano a partir de la especie *Vaccinium corymbosum*, variedad Ventura, crecida en Perú, al que denominamos BBHE. El contenido polifenólico de los extractos de arándano varía en función de la técnica de extracción y de los disolventes utilizados (447–449). El extracto de arándanos utilizado en nuestro estudio se produjo en un sistema de temperatura ambiente a media escala (*medium scale ambient temperature system*; **MSAT**). Normalmente se utilizan combinaciones de agua y disolventes orgánicos para modular la polaridad final de la mezcla de extracción con el fin de maximizar la extracción de polifenoles de la materia prima inicial (448,449). Sin embargo, el BBHE se eluye en una solución salina sin glucosa denominada mHBSS (*modified Hank's balanced salt solution*; **mHBSS**). El uso de mHBSS permitió una extracción eficaz de los polifenoles bioactivos en un medio compatible con el uso en clínica.

El BBHE contiene representantes de algunas de las principales familias de polifenoles. Esto es interesante porque indica que el disolvente acuoso, mHBSS, es capaz de extraer los polifenoles más polares, principalmente los no flavonoides, los compuestos de polaridad intermedia, como los flavan-3-oles, y los compuestos de baja polaridad en términos relativos, como los flavonoles y las antocianinas. Las procianidinas son proantocianidinas construidas a partir de flavan-3-oles (+)-catequina y (-)-epicatequina y abarcan una gran variedad de polaridades debido a su diversidad

y complejidad estructural. Las procianidinas se clasifican en tipo A y tipo B en función de la configuración estereoscópica y el enlace entre monómeros (450), siendo las procianidinas de tipo B (B1, B2 y C1 en BE) las más polares, seguidas de las procianidinas C y A. Aunque la mezcla de extracción no incluía disolventes orgánicos, se cubrió casi toda la gama de polaridades. Esto se debe a que los polifenoles se liberan más fácilmente en un entorno salino que en agua pura, ya que la fuerza iónica es mayor. Esto se confirmó en un experimento adicional, en el que se utilizaron agua y mHBSS en extracciones comparativas, y se cuantificaron el ácido clorogénico, las quercetinas glicosiladas y las antocianinas totales como marcadores. La concentración de ácido clorogénico fue tres veces mayor cuando se utilizó mHBSS como disolvente de extracción que cuando se utilizó agua, y la concentración relativa fue aproximadamente dos veces mayor en los otros dos grupos de compuestos.

Los productos obtenidos a partir del arándano rojo se utilizan ampliamente en la profilaxis de las infecciones urinarias, basándose en su efecto anti-adhesivo, que impide la adhesión de las bacterias a los tejidos del hospedador. Se sabe que muchos productos de origen vegetal tienen propiedades que impiden la adhesión de patógenos clínicos (451,452), y los compuestos que son capaces de prevenir y/o tratar la adhesión bacteriana a las superficies son deseables como agentes antibacterianos. En este trabajo investigamos el efecto del BBHE sobre la adherencia de la cepa Kp3380 a superficies bióticas y abióticas. Observamos que el BBHE reduce, de forma dependiente de la concentración, la producción de *biofilm*, producida por la cepa Kp3380. Ninguna de las concentraciones utilizadas afectó al crecimiento bacteriano. Estos resultados son consistentes con estudios previos *in vitro* que observaron los efectos de los polifenoles del arándano y del arándano rojo sobre la formación de *biofilm* por parte de *P. aeruginosa* y *E. coli* (453,454). También se ha demostrado que los oligosacáridos

derivados del arándano, solos y en combinación con compuestos fenólicos, reducen la formación de *biofilm* en *E. coli* (455). En este estudio también observamos que la interacción entre la cepa Kp3380 y las células colorrectales HT-29 en presencia del BBHE era significativamente menor. Este efecto también fue dependiente de la concentración. Se han descrito resultados similares en *Salmonella typhimurium*, dónde dos extractos de arándano y mora provocaron una reducción de la adherencia a las células intestinales INT407 (456). También se demostró la reducción de la adherencia de *Helicobacter pylori* a las células HT-29 por una molécula de alto peso molecular presente en los arándano, siendo el efecto también dependiente de la concentración (457). Los datos existentes sugieren que un extracto que contenga la mayoría de los polifenoles tendrá un efecto mayor que un extracto compuesto por un solo polifenol (458,459). Esto puede explicarse por las interacciones sinérgicas entre los diferentes polifenoles de la planta, ya que los mecanismos de acción antibacteriana son diversos y la planta sintetiza varios compuestos para atacar a sus potenciales enemigos y/o para reaccionar en situaciones de estrés (458). De hecho, recientemente se ha descrito que el efecto antiadherente del extracto de arándano frente a *E. coli* no puede atribuirse a un único compuesto (460). Como se sugiere en el presente estudio, la eficacia del extracto se deriva probablemente de la acción sinérgica de varios polifenoles como, en el caso de nuestro extracto, los glucósidos flavonoides, en particular los glucósidos de quercetina y miricetina, las antocianidinas, las proantocianidinas de tipo A y B, y los derivados de los ácidos benzoico e hidroxicinámico.

Para explorar esta hipótesis, seleccionamos diferentes polifenoles basándonos en su abundancia relativa en el BBHE. Examinamos el efecto sobre la adherencia a las células colorectales HT-29 de tres antocianidinas (malvidina, delfinidina y cianidina), dos ácidos hidroxicinámicos (clorogénico y cafeico), un flavan-3 ol (catequina) y un

flavonol (quercetina). Todas las antocianinas, junto con el ácido cafeico, causaron una reducción de la adhesión de la cepa Kp3380 a las células colorrectales. El polifenol más activo fue la delphinidina, mientras que la catequina y la quercetina no mostraron propiedades antiadhesivas. Se ha demostrado recientemente una atenuación de los factores de virulencia y la patogenicidad en *P. aeruginosa* por la regulación del *quórum* y la inhibición de la formación de *biofilm* causada por el ácido clorogénico (461). Sin embargo, en nuestro trabajo no observamos ningún efecto del ácido clorogénico sobre la adhesión bacteriana a las células intestinales. Aunque la concentración de los polifenoles individuales es significativamente menor en el extracto total, el BBHE fue más activo, probablemente debido a las interacciones sinérgicas entre los diferentes polifenoles. La presencia de oligosacáridos en el BBHE probablemente también contribuya positivamente a sus propiedades antiadherentes, ya que se ha descubierto que participan en la reducción de la adhesión de diferentes patógenos a las células eucariotas (462,463). Como la adhesión de la cepa Kp3380 a las células HT-29 se reduce en presencia de BBHE, nos preguntamos si las superficies de las células bacterianas o eucariotas se verían afectadas. Se observó mediante microscopia de barrido que el BHEE reduce la capacidad de adhesión de la cepa Kp3380 a las células HT-29. También observamos que esta cepa tiende a formar agregados en la superficie de las células intestinales, sin embargo, no observamos agregados bacterianos multicelulares cuando las células HT-29 son infectadas en presencia de BBHE. Por lo tanto, además de impedir la adhesión de las bacterias a los tejidos del hospedador, el BBHE también podría facilitar la eliminación de las bacterias del hospedador, ya que los agregados de bacterias son más resistentes a las condiciones de estrés, así como a la exposición a tratamientos antimicrobianos. Además, aunque no se observaron cambios significativos en la morfología bacteriana,

la superficie de las células eucariotas se vio afectada considerablemente cuando se incubaron en presencia de BBHE.

Teniendo en cuenta las propiedades antiadherentes *in vitro* del BBHE, decidimos investigar el rendimiento del extracto como tratamiento de descolonización en un modelo murino *in vivo*. La colonización del tracto gastrointestinal es probablemente el reservorio más común y significativo de *K. pneumoniae* (88,400). Por lo tanto, el establecimiento de protocolos de intervención eficientes para prevenir la colonización y la posterior infección sería de gran valor. Se ha demostrado que el extracto BHEE reduce de forma significativa la colonización intestinal con Kp3380 en un modelo murino. Estos resultados son coherentes con los de un estudio anterior sobre la colonización intestinal con *S. typhimurium* en pollos tratados con un extracto combinado de mora y arándano, en el que se redujo la colonización del ciego (456). Del mismo modo, un modelo en cerdos infectados con *E. coli* demostró que la administración de alimentos y agua suplementados con extracto de arándano rojo redujo significativamente el establecimiento de la infección (464).

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos descrito y analizado un importante brote hospitalario causado por un clon de alto riesgo ST15 productor de OXA-48 con una elevada capacidad para colonizar el tracto intestinal de los pacientes. El análisis genético y fenotípico de este clon epidémico nos permitió identificar por primera vez en *K. pneumoniae* dos factores de patogenicidad relacionados con su alta capacidad de adherencia: el sistema CUP Kpi y el sistema TPS FhaB/FhaC.

La presencia de estos sistemas puede ser crucial para el éxito epidémico de *K. pneumoniae* ST15, al contribuir positivamente a la persistencia de este clon en el hospedador durante largos intervalos de tiempo y a su transferencia efectiva entre

diferentes hospedadores. Por otra parte, considerando que ambos sistemas están claramente asociados con el clon ST15 se propone su uso como biomarcadores

para identificar y monitorizar la diseminación de este clon de alto riesgo. Se ha diseñado una nueva PCR múltiple que puede detectar el HRc *K. pneumoniae* ST15 de forma rápida y eficaz con respecto a las técnicas convencionales, el MLST y la WGS. Nuestros resultados sugieren que esta técnica puede ser una herramienta útil para la vigilancia molecular, el control y la rápida respuesta ante la alta incidencia de cepas de *K. pneumoniae* ST15. Finalmente, obtuvimos y caracterizamos un extracto de arándano rico en antocianinas con propiedades antiadherentes *in vitro* e *in vivo*. Demostramos que este extracto impide la adhesión de una cepa de *K. pneumoniae* altamente adherente a superficies abióticas y bióticas. Además, observamos también el efecto antiadherente en un modelo de colonización murino, lo que sugiere su posible uso como estrategia de descolonización. Se han realizado pocos estudios sobre el uso de extractos de arándano como tratamiento de descolonización o como coadyuvante de los tratamientos ya existentes, por lo que los hallazgos del presente estudio pueden conducir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

Capítulo I. Secuenciación del genoma de dos cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 aisladas durante un gran brote en España.

1. Las cepas *Klebsiella pneumoniae* Kp3380 y Kp1803 tienen un genoma con un contenido de G+C del 57.2% en ambos casos, un tamaño estimado de 6.1 y 6.6 Mb y un número de secuencias codificantes de 5381 y 5331, respectivamente.

Capítulo II. Kpi, un sistema chaperona-usher pili asociado al clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15 ampliamente diseminado por todo el mundo.

2. La habilidad del clon de alto riesgo *K. pneumoniae* ST15 para colonizar el tracto intestinal y diseminarse podría estar determinada por su fenotipo altamente adherente.
3. La presencia del sistema Kpi en *K. pneumoniae* determina su fenotipo adherente.
4. El sistema Kpi está implicado en la capacidad de *K. pneumoniae* Kp3380 de formar *biofilm* y de adherirse a distintos tipos celulares.
5. El sistema Kpi tienen un papel determinante en la habilidad mostrada por *K. pneumoniae* Kp3380 para colonizar el tracto gastrointestinal.
6. El sistema Kpi contribuye en la virulencia de *K. pneumoniae* Kp3380 en un modelo de *Galleria mellonella*.
7. El sistema Kpi está estrechamente relacionado con el clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15.

Capítulo III. Rasgos genómicos que promueven la diseminación y la persistencia del clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15 productor de OXA-48 en España.

8. El clon ST15 posee características genómicas específicas que favorecieron su diseminación en detrimento de otros STs durante el brote hospitalario ocurrido en A Coruña.

9. El sistema KpFhaB/FhaC está implicado en la capacidad de *K.pneumoniae* Kp3380 de formar *biofilm* y de adherirse a células eucariotas intestinales.
10. Los sistemas Kpi y KpFhaB/FhaC, implicados en el fenotipo adherente de *K. pneumoniae* ST15, están estrechamente relacionados con este ST y le confieren una mayor eficacia biológica.
11. Ambos sistemas podrían ser usados como diana para detectar el clon de alto riesgo ST15 con una alta sensibilidad y especificidad.
12. El sistema de dos componentes FhaB/FhaC está estrechamente relacionado con el clon de alto riesgo *Klebsiella pneumoniae* ST15.
13. La PCR multiplex diseñada para la detección del clon de alto riesgo ST15 utilizando los sistemas Kpi y FhaB/FhaC posee una sensibilidad del 100%, una especificidad del 97.78%, un valor predictivo positivo del 81,25% y un valor predictivo negativo del 100%. Estos valores se ven mejorados al calcularlos de forma predictiva al testarlos en un mayor número de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* pertenecientes a 32 países europeos, siendo los valores obtenidos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo el 100%, 99.4%, 94.16% y 100%, respectivamente.

Capítulo IV. Actividad antiadhesiva de un extracto polifenólico de *Vaccinium corymbosum* dirigido a la colonización intestinal causada por *Klebsiella pneumoniae*.

14. Se ha obtenido un extracto de *Vaccinium corymbosum* en suero salino con alto contenido en compuestos polifenólicos.
15. El extracto de *Vaccinium corymbosum* inhibe la adhesión a células eucariotas intestinales y la producción de *biofilm* en *K. pneumoniae* Kp3380.
16. El efecto antiadherente producido por el extracto de *Vaccinium corymbosum* es superior al producido, de manera independiente, por los diferentes polifenoles mayoritarios.
17. El extracto de *Vaccinium corymbosum* reduce la colonización intestinal producida por *K. pneumoniae* Kp3380 en un modelo murino.

18. El extracto de *Vaccinium corymbosum* podría ser utilizado como estrategia de descolonización.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella* [Internet]. Vol. 7, International Microbiology. 2004 [cited 2021 Jun 13]. p. 261–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15666246/>
2. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. Brock Biology of Microorganisms 13th Edition. Benjamin Cummings. 2009.
3. De Freitas LC. WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Cad Pesqui. 2013;43(148):348–65.
4. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. <https://www.who.int/>. 2020 [cited 2021 Apr 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
5. ECDC. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae-second update Event background Current situation of CRE in EU/EEA countries. Ecdc. 2019;(September):1–17.
6. Zhang R, Lin D, Chan EWC, Gu D, Chen GX, Chen S. Emergence of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in China. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jan 1;60(1):709–11.
7. Grimont PAD, Grimont F. *Klebsiella*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. p. 1–26.
8. Gujarati S, Chaudhari D, Hagir A, Khairnar M, Shouche Y, Rahi P. *Klebsiella indica* sp. Nov., isolated from the surface of a tomato. Int J Syst Evol Microbiol. 2020;70(5):3278–86.
9. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Vol. 11, Clinical Microbiology Reviews. 1998. p. 589–603.
10. Bagley ST. Habitat association of *Klebsiella* species. Vol. 6, Infection Control. 1985. p. 52–8.
11. Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. Appl Microbiol. 1974;28(4):672–8.

12. Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(3):915–24.
13. Fevre C, Passet V, Weill FX, Grimont PAD, Brisse S. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5149–52.
14. Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., And demonstration th. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Sep 1;64(Pt 9):3146–52.
15. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. *Syst Appl Microbiol*. 2004;27(1):27–35.
16. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Jul 7;112(27):E3574–81.
17. Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae* , *Klebsiella variicola* , and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere*. 2017 Aug 2;2(4):290–307.
18. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *klebsiella pneumoniae*, *klebsiella quasipneumoniae*, *klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol*. 2018 Dec 7;9(DEC).
19. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo TA, Criscuolo A, Brisse S. Description of *Klebsiella africanensis* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. *tropicalensis* subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. *Res Microbiol*. 2019 Apr 1;170(3):165–70.
20. Wesley Long S, Linson SE, Saavedra MO, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al.

- Whole-genome sequencing of a human clinical isolate of the novel species *Klebsiella quasivariicola* sp. nov. *Genome Announc.* 2017 Oct 1;5(42).
21. Imai K, Ishibashi N, Kodana M, Tarumoto N, Sakai J, Kawamura T, et al. Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC Infect Dis.* 2019 Nov 8;19(1).
 22. Mathers AJ, Crook D, Vaughan A, Barry KE, Vegesana K, Stoesser N, et al. *Klebsiella quasipneumoniae* provides a window into carbapenemase gene transfer, plasmid rearrangements, and patient interactions with the hospital environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Jun 1;63(6).
 23. Brinkac LM, White R, D'Souza R, Nguyen K, Obaro SK, Fouts DE. Emergence of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-5) in *Klebsiella quasipneumoniae* from Neonates in a Nigerian Hospital. *mSphere.* 2019 Mar 13;4(2):685–703.
 24. Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. Vol. 8, *Emerging Microbes and Infections.* Taylor and Francis Ltd.; 2019. p. 973–88.
 25. Breurec S, Melot B, Hoen B, Passet V, Schepers K, Bastian S, et al. Liver abscess caused by infection with community-acquired *klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Quasipneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2016 Mar 1;22(3):529–31.
 26. Brisse S, Van Duijkeren E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet Microbiol.* 2005 Feb 25;105(3–4):307–12.
 27. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019;4(11):1919–29.
 28. Friedlaender C. No Title Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med.* 87(2):319–324.
 29. Rock C, Thom KA, Masnick M, Johnson JK, Harris AD, Morgan DJ. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014 Apr;35(4):426–9.
 30. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG,

- et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar 1;18(3):268–81.
31. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan;48(1):1–12.
 32. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar;42(5):657–68.
 33. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan;46(2):155–64.
 34. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629–61.
 35. Dao TT, Liebenthal D, Tran TK, Vu BNT, Nguyen DNT, Tran HKT, et al. *Klebsiella pneumoniae* oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. *PLoS One*. 2014;9(3):e91999.
 36. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;
 37. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Keynan Y, et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An emerging and under-recognized pathogenic variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jun;31(6):981–9.
 38. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):107–18.
 39. Liu YC, Cheng DL, Lin CL. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Associated With Septic Endophthalmitis. *Arch Intern Med*. 1986 Oct 1;146(10):1913–6.
 40. Wang JH, Liu YC, Lee SSJ, Yen MY, Chen YS, Wang JH, et al. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 1998;26(6):1434–8.
 41. Lok KH, Li KF, Li KK, Szeto ML. Pyogenic liver abscess: Clinical profile,

- microbiological characteristics, and management in a Hong Kong hospital. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008;41(6):483–90.
42. Yeoh KG. Tropical liver abscess. *Postgrad Med J.* 1997;73(856):89–92.
 43. Fazili T, Sharngoe C, Endy T, Kiska D, Javaid W, Polhemus M. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: An Emerging Disease. Vol. 351, *American Journal of the Medical Sciences.* Elsevier B.V.; 2016. p. 297–304.
 44. Pastagia M, Arumugam V. *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses in a public hospital in Queens, New York. *Travel Med Infect Dis.* 2008 Jul;6(4):228–33.
 45. Turton JF, Englender H, Gabriel SN, Turton SE, Kaufmann ME, Pitt TL. Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents. *J Med Microbiol.* 2007 May;56(5):593–7.
 46. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Dominguez MA, Liñares J, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). *Clin Microbiol Infect.* 2016 Feb 1;22(2):154–60.
 47. Sánchez-López J, García-Caballero A, Navarro-San Francisco C, Quereda C, Ruiz-Garbajosa P, Navas E, et al. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: A challenge in community acquired infection. *IDCases.* 2019 Jan 1;17.
 48. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: A new invasive syndrome. Vol. 12, *The Lancet Infectious Diseases.* Lancet Publishing Group; 2012. p. 881–7.
 49. Zhu J, Wang T, Chen L, Du H. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 12, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
 50. Fung CP, Chang FY, Lee SC, Hu BS, Kuo BIT, Liu CY, et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: Is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut.* 2002;50(3):420–4.
 51. Lederman ER, Crum NF. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: An emerging disease with unique clinical characteristics. Vol. 100, *American Journal of Gastroenterology.* Am J Gastroenterol; 2005. p. 322–31.
 52. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu YC, Wang RS. Septic Metastatic Lesions of Pyogenic Liver Abscess: Their Association With *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Diabetic Patients. *Arch Intern Med.* 1991;151(8):1557–9.
 53. Han SHB. Review of hepatic abscess from *Klebsiella pneumoniae* - An

- association with diabetes mellitus and septic endophthalmitis. Vol. 162, Western Journal of Medicine. 1995. p. 220–4.
54. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: An emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. Clin Infect Dis. 2007 Aug 1;45(3):284–93.
 55. Dylewski JS, Dylewski I. Necrotizing Fasciitis with *Klebsiella* Liver Abscess. Clin Infect Dis. 1998 Dec 1;27(6):1561–2.
 56. Chen SC, Wu WY, Yeh CH, Lai KC, Cheng KS, Jeng L Bin, et al. Comparison of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses. Am J Med Sci. 2007 Aug;334(2):97–105.
 57. Lai YC, Lu MC, Hsueh PR. Hypervirulence and carbapenem resistance: two distinct evolutionary directions that led high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones to epidemic success. Vol. 19, Expert Review of Molecular Diagnostics. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 825–37.
 58. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2018 Jan 1;18(1):37–46.
 59. Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Clin Infect Dis. 2014 Jan 15;58(2):225–32.
 60. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. BMC Microbiol. 2010;10.
 61. Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology. 2003;149(9):2397–405.
 62. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. International Prospective Study of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Extended-Spectrum β -Lactamase Production in Nosocomial Infections. Ann Intern Med. 2004;140(1):26–32.
 63. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella*

- pneumoniae carbapenemases. Vol. 13, *The Lancet Infectious Diseases*. 2013. p. 785–96.
64. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE, C Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology* Nature Research; Jun 1, 2020 p. 344–59.
 65. Henson SP, Boinett CJ, Ellington MJ, Kagia N, Mwarumba S, Nyongesa S, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* invasive infections over a decade at Kilifi County Hospital in Kenya. *Int J Med Microbiol*. 2017 Oct 1;307(7):422–9.
 66. Brockhurst MA, Harrison E, Hall JPJ, Richards T, McNally A, MacLean C. The Ecology and Evolution of Pangenomes. Vol. 29, *Current Biology*. Cell Press; 2019. p. R1094–103.
 67. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis*. 2014 Nov 1;20(11):1812–20.
 68. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):4178–82.
 69. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009 Mar 25;4(3).
 70. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le TAH, Cao V, Ngandjio A, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: Multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(4):349–55.
 71. McInerney JO, McNally A, O’Connell MJ. Why prokaryotes have pangenomes [Internet]. Vol. 2, *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Apr 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28350002/>
 72. Chen N, Ou HY, Van Aartsen JJ, Jiang X, Li M, Yang Z, et al. The pheV phenylalanine tRNA gene in *klebsiella pneumoniae* clinical isolates is an integration hotspot for possible niche-adaptation genomic islands. *Curr*

- Microbiol. 2010 Mar;60(3):210–6.
73. Zhang J, van Aartsen JJ, Jiang X, Shao Y, Tai C, He X, et al. Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. *J Microbiol Methods*. 2011 Feb;84(2):283–9.
 74. Van Aartsen JJ, Stahlhut SG, Harrison EM, Crosatti M, Ou HY, Krogfelt KA, et al. Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 2012;12:59.
 75. Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet*. 2019;15(4):e1008114.
 76. Wyres KL, Gorrie C, Edwards DJ, Wertheim HFL, Hsu LY, Van Kinh N, et al. Extensive capsule locus variation and large-scale genomic recombination within the *Klebsiella pneumoniae* clonal group 258. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Apr 27];7(5):1267–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25861820/>
 77. Lam MMC, Wyres KL, Duchêne S, Wick RR, Judd LM, Gan YH, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Apr 27];9(1):1–10. Available from: www.nature.com/naturecommunications
 78. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genomics*. 2018 Sep 1;4(9).
 79. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic. *PLoS One*. 2015 Jul 21;10(7).
 80. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. Vol. 45, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 131–9.
 81. Conlan S, Park M, Deming C, Thomas PJ, Young AC, Coleman H, et al. Plasmid dynamics in KPC-positive *Klebsiella pneumoniae* during long-term

- patient colonization. MBio. 2016;7(3).
82. Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R. Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, and *enterobacter* species. *Front Microbiol.* 2019;10(MAR).
 83. Shen J, Lv L, Wang X, Xiu Z, Chen G. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. *J Basic Microbiol.* 2017 Apr 1;57(4):325–36.
 84. Ou HY, He X, Harrison EM, Kulasekara BR, Thani A Bin, Kadioglu A, et al. MobilomeFINDER: Web-based tools for in silico and experimental discovery of bacterial genomic islands. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jul;35(SUPPL.2):W97.
 85. Zhang R, Ou H-Y, Gao F, Luo H. Identification of Horizontally-transferred Genomic Islands and Genome Segmentation Points by Using the GC Profile Method. *Curr Genomics.* 2014 Apr 21;15(2):113–21.
 86. Bi D, Jiang X, Sheng ZK, Ngmenterebo D, Tai C, Wang M, et al. Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a “resistance-disarmed” model organism. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Oct 1;70(10):2770–4.
 87. Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, et al. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* 2008 Jul;4(7).
 88. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018.
 89. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565–91.
 90. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Oct 1;64(10).
 91. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. Vol. 41, *FEMS Microbiology Reviews.* Oxford University Press; 2017. p. 252–75.

92. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Mar 1;74(3):577–81.
93. Gorrie CL, Mirc Eta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017 Jul 15;65(2):208–15.
94. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos A V., Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, et al. A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan 1;60(1):332–42.
95. Andrade LN, Novais Â, Stegani LMM, Ferreira JC, Rodrigues C, Darini ALC, et al. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Jun 1;91(2):164–8.
96. Long SW, Olsen RJ, Eagar TN, Beres SB, Zhao P, Davis JJ, et al. Population genomic analysis of 1,777 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates, Houston, Texas: Unexpected abundance of clonal group 307. *MBio*. 2017;8(3).
97. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Judd LM, Wyres KL, Thomson NR, et al. Antimicrobial-resistant *klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. *Clin Infect Dis*. 2018 Jul 2;67(2):161–70.
98. Wyres KL, Nguyen TNT, Lam MMC, Judd LM, Van Vinh Chau N, Dance DAB, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome Med*. 2020 Jan 16;12(1):11.
99. Heinz E, Brindle R, Morgan-McCalla A, Peters K, Thomson NR. Caribbean multi-centre study of *Klebsiella pneumoniae*: whole-genome sequencing, antimicrobial resistance and virulence factors. *Microb genomics* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Apr 29];5(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31038449/>
100. Ejaz H, Wang N, Wilksch JJ, Page AJ, Cao H, Gujran S, et al. Phylogenetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* from hospitalized children, Pakistan. *Emerg*

- Infect Dis. 2017 Nov 1;23(11):1872–5.
101. Cerqueira GC, Earl AM, Ernst CM, Grad YH, Dekker JP, Feldgarden M, et al. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 31;114(5):1135–40.
 102. Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio*. 2017 Jan 1;8(1).
 103. Liu L, Feng Y, Tang G, Lin J, Huang W, Qiao F, et al. Carbapenem-resistant Isolates of the *Klebsiella pneumoniae* Complex in Western China: The Common ST11 and the Surprising Hospital-specific Types. *Clin Infect Dis*. 2018 Nov 13;67(suppl_2):S263–5.
 104. DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 1;111(13):4988–93.
 105. Lowe M, Kock MM, Coetzee J, Hoosien E, Peirano G, Strydom KA, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST307 with bla_{oxa}-181, South Africa, 2014–2016. *Emerg Infect Dis*. 2019 Apr 1;25(4):739–47.
 106. Oteo-Iglesias J, Pérez-Vazquez M, Campoy PS, Moure Z, Romero IS, Benito RS, et al. Emergence of blood infections caused by carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae* ST307 in Spain. Vol. 75, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2020. p. 3402–5.
 107. Heinz E, Ejaz H, Bartholdson Scott J, Wang N, Gujran S, Pickard D, et al. Resistance mechanisms and population structure of highly drug resistant *Klebsiella* in Pakistan during the introduction of the carbapenemase NDM-1. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
 108. Chung The H, Karkey A, Pham Thanh D, Boinett CJ, Cain AK, Ellington M, et al. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO Mol Med*. 2015 Mar;7(3):227–39.
 109. Turton JF, Payne Z, Coward A, Hopkins KL, Turton JA, Doumith M, et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-st23 and ‘non-hypervirulent’ types ST147, ST15 and ST383. *J Med Microbiol*. 2018 Jan

- 1;67(1):118–28.
110. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
 111. Lam MMC, Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Fostervold A, Holt KE, et al. Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. *J Antimicrob Chemother*. 2019 May 1;74(5):1218–22.
 112. Damjanova I, Tóth Á, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 - The new “MRSAs”? *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):978–85.
 113. Madueño A, González García J, Fernández-Romero S, Oteo J, Lecuona M. Dissemination and clinical implications of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 in a Spanish hospital. *J Hosp Infect*. 2017 Jun 1;96(2):116–22.
 114. Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Phu TT, et al. Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2017 Jul 4;17(1).
 115. Shu L, Dong N, Lu J, Zheng Z, Hu J, Zeng W, et al. Emergence of OXA-232 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* That Carries a pLVPK-Like Virulence Plasmid among Elderly Patients in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Mar 1;63(3).
 116. Vubil D, Figueiredo R, Reis T, Canha C, Boaventura L, Da Silva GJ. Outbreak of KPC-3-producing ST15 and ST348 *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese hospital. *Epidemiol Infect*. 2017 Feb 1;145(3):595–9.
 117. Markovska R, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS*. 2015 Oct 1;123(10):887–94.
 118. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-

- producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Feb;66(2):307–12.
119. Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, et al. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec;68(12):2802–8.
 120. Poirel L, Nordmann P, Ducroz S, Boulouis HJ, Arné P, Millemann Y. Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 May;57(5):2372–5.
 121. Ewers C, Stamm I, Pfeifer Y, Wieler LH, Kopp PA, Schønning K, et al. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Oct 1;69(10):2676–80.
 122. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Usui M, et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* spp. isolates from companion animals in Japan: Clonal dissemination of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2016;7(JUN).
 123. Aghamohammad S, Badmasti F, Solgi H, Aminzadeh Z, Khodabandelo Z, Shahcheraghi F. First Report of Extended-Spectrum Betalactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* among Fecal Carriage in Iran: High Diversity of Clonal Relatedness and Virulence Factor Profiles. *Microb Drug Resist.* 2020 Mar 1;26(3):261–9.
 124. Raro OHF, da Silva RMC, Filho EMR, Sukiennik TCT, Stadnik C, Dias CAG, et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. *Front Microbiol.* 2020 Jul 15;11.
 125. León-Sampedro R, DelaFuente J, Díaz-Agero C, Crellen T, Musicha P, Rodríguez-Beltrán J, et al. Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat Microbiol.* 2021;
 126. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Carmen Turrientes M, Díaz-Agero C, López-Fresneña N, Bonten M, et al. Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital

- in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Nov 1;73(11):3039–43.
127. Qin X, Wu S, Hao M, Zhu J, Ding B, Yang Y, et al. The colonization of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*: epidemiology, resistance mechanisms, and risk factors in patients admitted to intensive care units in China. *J Infect Dis.* 2020 Mar 16;221(Supplement_2):S206–14.
 128. Siu LK, Fung CP, Chang FY, Lee N, Yeh KM, Koh TH, et al. Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3761–5.
 129. Lin JC, Koh TH, Lee N, Fung CP, Chang FY, Tsai YK, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathog.* 2014 Jun 12;6(1).
 130. Shi Q, Lan P, Huang D, Hua X, Jiang Y, Zhou J, et al. Diversity of virulence level phenotype of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from different sequence type lineage. *BMC Microbiol.* 2018 Aug 29;18(1):94.
 131. Lee IR, Molton JS, Wyres KL, Gorrie C, Wong J, Hoh CH, et al. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. *Sci Rep.* 2016 Jul 13;6(1):1–12.
 132. Zhang Y, Zhao C, Wang Q, Wang X, Chen H, Li H, et al. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in China: Geographic distribution, clinical characteristics, and antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Oct 1;60(10):6115–20.
 133. Musicha P, Msefula CL, Mather AE, Chaguza C, Cain AK, Peno C, et al. Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates from Malawi reveals acquisition of multiple ESBL determinants across diverse lineages. *J Antimicrob Chemother.* 2019 May 1;74(5):1223–32.
 134. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Vol. 59, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2015. p. 5873–84.

135. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect.* 2015 May 1;21(5):470.e1-470.e7.
136. Hu L, Liu Y, Deng L, Zhong Q, Hang Y, Wang Z, et al. Outbreak by ventilator-associated ST11 *K. pneumoniae* with co-production of CTX-M-24 and KPC-2 in a SICU of a tertiary teaching hospital in central China. *Front Microbiol.* 2016 Aug 2;7(1190).
137. Endimiani A, DePasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, et al. Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: A new challenge to our healthcare system. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep 9;64(5).
138. Adler A, Katz DE, Marchaim D. The Continuing Plague of Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae Infections. Vol. 30, *Infectious Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2016. p. 347–75.
139. Eliopoulos GM, Schwaber MJ, Carmeli Y. An ongoing national intervention to contain the spread of carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis.* 2014 Mar;58(5):697–703.
140. Gottesman T, Agmon O, Shwartz O, Dan M. Household transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 14, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2008. p. 859–60.
141. Nordmann P, Couard JP, Sansot D, Poirel L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. Vol. 54, *Clinical Infectious Diseases*. *Clin Infect Dis*; 2012. p. 150–1.
142. Khatri A, Murphy NN, Wiest P, Osborn M, Garber K, Hecker M, et al. Community-acquired pyelonephritis in pregnancy caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug 1;59(8):4375–8.
143. Marques C, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Trigueiro G, Gama LT, et al. Evidence of Sharing of *Klebsiella pneumoniae* Strains between Healthy Companion Animals and Cohabiting Humans. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2019 Jun 1 [cited 2021 Jun 15];57(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30944193/>

144. Van der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Sep;67(9):2090–100.
145. Rogers BA, Aminzadeh Z, Hayashi Y, Paterson DL. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. Vol. 53, *Clinical Infectious Diseases. Clin Infect Dis*; 2011. p. 49–56.
146. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):818–20.
147. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Fuller J, Rubin JE, Pitout JDD. Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: The first 3 years. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1575–81.
148. Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-venezia S, Dhaher Y, Edgar R, et al. Introduction of OXA-48-producing enterobacteriaceae to israeli hospitals by medical tourism. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec;66(12):2763–6.
149. Bogaerts P, Rezende De Castro R, Deplano A, Bouchahrouf W, Tsobo C, Denis O, et al. Detection of a VIM-27-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in a patient following surgical tourism in Greece. Vol. 55, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother*; 2011. p. 4488–9.
150. Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen M, Morach M, Berner AZ, Hächler H, Stephan R. Extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(9):3115–20.
151. Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: A perspective from Asia. *Clin Infect Dis.* 2013 May 1;56(9):1310–8.
152. Soria-Segarra C, González-Bustos P, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Rojo-Martín MD, Fernández-Sierra MA, et al. Tracking KPC-3-producing ST-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristics. *Mol Biol Rep.* 2020 Feb 1;47(2):1089–97.
153. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11

- clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(8):2091–7.
154. Hrabák J, Papagiannitsis CC, Študentová V, Jakubu V, Fridrichová M, Zemlickova H, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. *Eurosurveillance.* 2013;18(45).
 155. Zweigner J, Gastmeier P, Kola A, Klefisch FR, Schweizer C, Hummel M. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak following bronchoscopy. Vol. 42, *American Journal of Infection Control.* Mosby Inc.; 2014. p. 936–7.
 156. Gharbi M, Moore LSP, Gilchrist M, Thomas CP, Bamford K, Brannigan ET, et al. Forecasting carbapenem resistance from antimicrobial consumption surveillance: Lessons learnt from an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a West London renal unit. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jul 20;46(2):150–6.
 157. Gaibani P, Colombo R, Arghittu M, Cariani L, Ambretti S, Bua G, et al. Successful containment and infection control of a Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in an Italian hospital. Vol. 37, *New Microbiologica.* 2014. p. 87–90.
 158. Brizendine KD, Richter SS, Cober ED, Van Duin D. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection following solid organ transplantation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan 1;59(1):553–7.
 159. Savard P, Perl TM. Combating the spread of carbapenemases in Enterobacteriaceae: A battle that infection prevention should not lose. Vol. 20, *Clinical Microbiology and Infection.* Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 854–61.
 160. Van Loon K, Voor In'T Holt AF, Vos MC. A systematic review and meta-analyses of the clinical epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae. Vol. 62, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 2018.
 161. Ben-David D, Masarwa S, Navon-Venezia S, Mishali H, Fridental I, Rubinovitch B, et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Post-Acute-Care Facilities in Israel. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011 Sep;32(9):845–53.
 162. Nucleo E, Caltagirone M, Marchetti VM, D'Angelo R, Fogato E, Confalonieri

- M, et al. Colonization of long-term care facility residents in three Italian Provinces by multidrug-resistant bacteria. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Mar 6;7(1).
163. Legeay C, Hue R, Berton C, Cormier H, Chenouard R, Corvec S, et al. Control strategy for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in nursing homes: perspectives inspired from three outbreaks. *J Hosp Infect*. 2019 Feb 1;101(2):183–7.
 164. Piazza A, Caltagirone M, Bitar I, Nucleo E, Spalla M, Fogato E, et al. Emergence of Escherichia coli sequence type 131 (ST131) and st3948 with KPC-2, KPC-3 and KPC-8 carbapenemases from a long-term care and rehabilitation facility (LTCRF) in Northern Italy. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 77–89.
 165. Decraene V, Phan HTT, George R, Wyllie DH, Akinremi O, Aiken Z, et al. A large, refractory nosocomial outbreak of klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Escherichia coli demonstrates carbapenemase gene outbreaks involving sink sites require novel approaches to infection control. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Dec 1;62(12).
 166. Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing Klebsiella pneumoniae Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. *PLoS One*. 2013 Mar 11;8(3).
 167. Weingarten RA, Johnson RC, Conlan S, Ramsburg AM, Dekker JP, Lau AF, et al. Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. *MBio*. 2018 Jan 1;9(1).
 168. Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, et al. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Transl Med*. 2014 Sep 17;6(254).
 169. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Vol. 4, *Frontiers in Microbiology*. 2013.
 170. Piddock LJ V. The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? Vol. 12, *The Lancet Infectious Diseases*. 2012. p. 249–53.
 171. Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. *The Future of Antibiotics and Resistance*.

- N Engl J Med. 2013;368(4):299–302.
172. Frieden T. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Centers Dis Control Prev.* 2013;(11–17):114.
 173. MacLean RC, Millan AS. The evolution of antibiotic resistance. *Science* (80-). 2019 Sep 13;365(6458):1082–3.
 174. Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 35, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Springer Verlag; 2016. p. 333–41.
 175. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(2):302–7.
 176. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 11, *Infection, Genetics and Evolution. Infect Genet Evol*; 2011. p. 1499–504.
 177. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. Vol. 27, *Korean Journal of Internal Medicine. Korean J Intern Med*; 2012. p. 128–42.
 178. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):500–10.
 179. Calbo E, Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: The CTX-M-15 type consolidation. Vol. 10, *Future Microbiology. Future Medicine Ltd.*; 2015. p. 1063–75.
 180. Cristina DA, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, Hernandez Garcia M, Ruiz-Garbajosa P, Aranaz-Andrés JM, et al. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: A prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open.* 2019 Mar 1;9(3).
 181. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241–63.
 182. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century:

- Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Vol. 14, *Clinical Microbiology Reviews*. Clin Microbiol Rev; 2001. p. 933–51.
183. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A structure-based classification of class A β -Lactamases, a broadly diverse family of enzymes. Vol. 29, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2016. p. 29–57.
 184. Li P, Shen K, Zhang Y, Ying J, Zhu T, Liu Y, et al. Characterization of a novel blaKLUC variant with reduced β -lactam resistance from an IncA/C group plasmid in a clinical klebsiella pneumoniae isolate. *Front Microbiol*. 2018 Aug 15;9(AUG).
 185. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):177–83.
 186. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. Vol. 14, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2008. p. 82–9.
 187. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. Vol. 22, *Clinical Microbiology Reviews*. Clin Microbiol Rev; 2009. p. 161–82.
 188. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. Vol. 14, *Critical Care*. Crit Care; 2010. p. 1–8.
 189. Zamorano L, Miró E, Juan C, Gómez L, Bou G, González-López JJ, et al. Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from enterobacteriaceae: Findings from a multicenter study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep 1;59(9):5260–6.
 190. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(3):563–9.
 191. Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Vol. 14, *Trends in Microbiology*. Trends Microbiol; 2006. p. 413–20.

192. van de Klundert JAM, van Gestel MH, Meerdink G, de Marie S. Emergence of bacterial resistance to cefamandole in vivo due to outer membrane protein deficiency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988 Dec;7(6):776–8.
193. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. Vol. 20, *Clinical Microbiology Reviews*. Clin Microbiol Rev; 2007. p. 440–58.
194. Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, et al. Functional analysis of the active site of a metallo- β -lactamase proliferating in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2304–9.
195. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151–61.
196. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15–22.
197. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5046–54.
198. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. Vol. 35, *FEMS Microbiology Reviews*. FEMS Microbiol Rev; 2011. p. 736–55.
199. Vázquez-Ucha JC, Arca-Suárez J, Bou G, Beceiro A. New carbapenemase inhibitors: Clearing the way for the β -lactams. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–32.
200. Ehmann DE, Jahić H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Durand-Réville TF, et al. Kinetics of avibactam inhibition against class A, C, and D β -lactamases. *J Biol Chem*. 2013 Sep 27;288(39):27960–71.
201. Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PRS, et al. Ceftazidime-avibactam: A novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. Vol. 73, *Drugs*. Drugs; 2013. p. 159–77.
202. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Chen L, Kreiswirth BN, Clancy CJ. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance and restoration of carbapenem

- susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: A case report and review of literature. *Open Forum Infect Dis*. 2017 Jul 1;4(3):1–4.
203. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, Stump S, Khan S, McConville TH, et al. Successive emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in blaKPC-2-harboring *klebsiella pneumoniae* sequence type 307 isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Mar 1;62(3).
 204. Gaibani P, Campoli C, Lewis RE, Volpe SL, Scaltriti E, Giannella M, et al. In vivo evolution of resistant subpopulations of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* during ceftazidime/avibactam treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Jun 1;73(6):1525–9.
 205. Hemarajata P, Humphries RM. Ceftazidime/avibactam resistance associated with L169P mutation in the omega loop of KPC-2. *J Antimicrob Chemother*. 2019 May 1;74(5):1241–3.
 206. Hobson CA, Bonacorsi S, Jacquier H, Choudhury A, Magnan M, Cointe A, et al. KPC Beta-Lactamases Are Permissive to Insertions and Deletions Conferring Substrate Spectrum Modifications and Resistance to Ceftazidime-Avibactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Dec 1;64(12).
 207. Both A, Büttner H, Huang J, Perbandt M, Belmar Campos C, Christner M, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Sep 1;72(9):2483–8.
 208. Barnes MD, Winkler ML, Taracila MA, Page MG, Desarbre E, Kreiswirth BN, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2 (KPC-2), substitutions at ambler position Asp179, and resistance to ceftazidime-avibactam: Unique antibiotic-resistant phenotypes emerge from β -lactamase protein engineering. *MBio*. 2017 Sep 1;8(5).
 209. Winkler ML, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. Activity of ceftazidime/avibactam against isogenic strains of *Escherichia coli* containing KPC and SHV β -lactamases with single amino acid substitutions in the Ω -loop. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Aug 1;70(8):2279–86.
 210. Humphries RM, Hemarajata P. Resistance to ceftazidime-Avibactam in *klebsiella pneumoniae* due to porin mutations & the increased expression of KPC-3. Vol. 61, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society

- for Microbiology; 2017.
211. Voulgari E, Kotsakis SD, Giannopoulou P, Perivolioti E, Tzouveleakis LS, Miriagou V. Detection in two hospitals of transferable ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to a novel VEB β -lactamase variant with a Lys234Arg substitution, Greece, 2019. Vol. 25, *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2020.
 212. Zhang P, Shi Q, Hu H, Hong B, Wu X, Du X, et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jan 1;26(1):124.e1-124.e4.
 213. Vázquez-Ucha JC, Seoane-Estévez A, Rodiño-Janeiro BK, González-Bardanca M, Conde-Pérez K, Martínez-Gutián M, et al. Activity of imipenem-relebactam against a Spanish nationwide collection of carbapenemase-producing Enterobacterales. *J Antimicrob Chemother*. 2021 May 12;76(6):1498–510.
 214. Xu M, Zhao J, Xu L, Yang Q, Xu H, Kong H, et al. Emergence of transferable ceftazidime-avibactam resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* due to a novel CMY AmpC β -lactamase in China. *Clin Microbiol Infect*. 2021 May;▪(0):1.
 215. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Jun 1;6(6).
 216. Benveniste R, Davies J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. Vol. Vol.42, *Annual Review of Biochemistry*. Annu Rev Biochem; 1973. p. 471–506.
 217. Doi Y, Wachino J ichi, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. Vol. 30, *Infectious Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2016. p. 523–37.
 218. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug 1;47(8):2565–71.
 219. Poulikakos P, Falagas ME. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. Vol. 14, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. Expert Opin Pharmacother; 2013. p. 1585–97.
 220. Yu F, Wang L, Pan J, Yao D, Chen C, Zhu T, et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of rmtB and armA genes in the same isolate. *Diagn*

- Microbiol Infect Dis. 2009 May;64(1):57–63.
221. Tsai YK, Liou CH, Lin JC, Ma L, Fung CP, Chang FY, et al. A suitable streptomycin-resistant mutant for constructing unmarked in-frame gene deletions using *rpsL* as a counter-selection marker. PLoS One. 2014 Sep 30;9(9).
 222. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? Vol. 26, Clinical Microbiology Reviews. Clin Microbiol Rev; 2013. p. 185–230.
 223. Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. The current case of quinolones: Synthetic approaches and antibacterial activity. Vol. 21, Molecules. MDPI AG; 2016.
 224. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Vol. 22, Trends in Microbiology. Elsevier Ltd; 2014. p. 438–45.
 225. Ward-Mcquaid JFNC, Jichlinski D, Macis R. Nalidixic acid in urinary infections. Br Med J. 1963 Nov 23;2(5368):1311–4.
 226. Guerra JG, Falconi E, Palomino JC, Benavente L, Antunez de Mayolo E. Clinical evaluation of norfloxacin versus cotrimoxazole in urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol. 1983 Jun;2(3):260–5.
 227. Davis B, Lilly HA, Lowbury EJ. Gram-negative bacilli in burns. J Clin Pathol. 1969;22(6):634–41.
 228. Rydberg J, Larsson C, Miörner H. Resistance to fluoroquinolones in *pseudomonas aeruginosa* and *klebsiella pneumoniae*. Scand J Infect Dis. 1994;26(3):317–20.
 229. Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, et al. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(3):699–701.
 230. Nam YS, Cho SY, Yang HY, Park KS, Jang JH, Kim YT, et al. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. Int J Antimicrob Agents. 2013 Feb;41(2):126–9.
 231. Guillard T, de Jong A, Limelette A, Lebreil AL, Madoux J, de Champs C.

- Characterization of quinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae recovered from diseased companion animals in Europe. *Vet Microbiol.* 2016 Oct 15;194:23–9.
232. Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(2):342–8.
 233. Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB efflux system: Expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Dec 1;46(12):3984–6.
 234. Ping Y, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and characterization of KdeA, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol Pharm Bull.* 2007 Oct;30(10):1962–4.
 235. Wong MHY, Chan EWC, Chen S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3290–7.
 236. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiol Spectr.* 2014 Oct 3;2(5).
 237. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998 Mar 14;351(9105):797–9.
 238. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. Vol. 56, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* J Antimicrob Chemother; 2005. p. 463–9.
 239. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. Qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Apr;67(4):886–97.
 240. Schultsz C, Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in enterobacteriaceae: Changing landscape and implications for therapy. *Drugs.* 2012;72(1):1–16.
 241. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):519–24.

242. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Vol. 2, Microbial Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd; 2009. p. 40–61.
243. Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Garza-Ramos U, et al. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. PLoS One. 2013 Oct 17;8(10).
244. Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, et al. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. J Glob Antimicrob Resist. 2016 Sep 1;6:5–9.
245. Tóth Á, Kocsis B, Damjanova I, Kristóf K, Jánvári L, Pászti J, et al. Fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones is diverse across clones of *Klebsiella pneumoniae* and may select for CTX-M-15 type extended-spectrum β -lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(5):837–43.
246. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Vol. 40, Clinical Infectious Diseases. Clin Infect Dis; 2005. p. 1333–41.
247. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: First report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother. 2007 Apr;59(4):786–90.
248. Clements A, Tull D, Jenney AW, Farn JL, Kim SH, Bishop RE, et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. J Biol Chem. 2007 May 25;282(21):15569–77.
249. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. PLoS Pathog. 2015;11(1):1–22.
250. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. PLoS Genet. 2008 Oct;4(10).

251. Llobet E, Campos MA, Giménez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3718–32.
252. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4762–6.
253. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan 1;70(1):75–80.
254. Wright GD. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. Vol. 5, *Nature Reviews Microbiology*. Nat Rev Microbiol; 2007. p. 175–86.
255. Srinivasan VB, Venkataramaiah M, Mondal A, Vaidyanathan V, Govil T, Rajamohan G. Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One*. 2012 Jul 25;7(7).
256. De Majumdar S, Veleba M, Finn S, Fanning S, Schneiders T. Elucidating the regulon of multidrug resistance regulator *rarA* in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1603–9.
257. Pal S, Verma J, Mallick S, Rastogi SK, Kumar A, Ghosh AS. Absence of the glycosyltransferase *wcaJ* in *klebsiella pneumoniae* atcc13883 affects biofilm formation, increases polymyxin resistance and reduces murine macrophage activation. *Microbiol (United Kingdom)*. 2019;165(8):891–904.
258. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb 1;16(2):161–8.
259. Livermore DM. Tigecycline: What is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother*. 2005 Oct;56(4):611–4.
260. Schedlbauer A, Kaminishi T, Ochoa-Lizarralde B, Dhimole N, Zhou S, López-Alonso JP, et al. Structural characterization of an alternative mode of tigecycline binding to the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*.

- 2015 May 1;59(5):2849–54.
261. Golan Y. Empiric therapy for hospital-acquired, Gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections: A systematic literature review of current and emerging treatment options. *BMC Infect Dis.* 2015 Aug 5;15(1).
 262. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. Vol. 121, *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 601–17.
 263. Källman O, Motakefi A, Wretling B, Kalin M, Olsson-Liljequist B, Giske CG. Cefuroxime non-susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing *ramA* and *acrA* and expressing *ompK35* at reduced levels. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):986–90.
 264. Villa L, Feudi C, Fortini D, García-Fernández A, Carattoli A. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Mar;58(3):1707–12.
 265. Ahn C, Yoon SS, Yong TS, Jeong SH, Lee K. The resistance mechanism and clonal distribution of tigecycline-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. *Yonsei Med J.* 2016 May 1;57(3):641–6.
 266. March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM, et al. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PLoS One.* 2013 Feb 15;8(2).
 267. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Vol. 75, *Annual Review of Biochemistry*. Annu Rev Biochem; 2006. p. 39–68.
 268. Cortés G, Borrell N, De Astorza B, Gómez C, Saulea J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 2002;70(5):2583–90.
 269. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol.* 2005 Nov;58(4):1054–73.
 270. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Yamaguchi K.

- Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2000;49(11):1003–10.
271. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):7107–14.
 272. Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*. 1992;60(6):2529–35.
 273. Evrard B, Balestrino D, Dosgilbert A, Bouya-Gachancard JLJ, Charbonnel N, Forestier C, et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 2010 Jan;78(1):210–9.
 274. Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. *Virulence*. 2014 Aug 15;5(6):673–9.
 275. Edmunds PN. Further klebsiella capsule types. *J Infect Dis*. 1954;94(1):65–71.
 276. Edwards PR, Fife MA. Capsule types of klebsiella. *J Infect Dis*. 1952;91(1):92–104.
 277. Orskov I, Fife-Asbury MA. New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. *Int J Syst Bacteriol*. 1977;27(4):386–7.
 278. Cryz SJ, Mortimer PM, Mansfield V, Germanier R. Seroepidemiology of *Klebsiella bacteremic* isolates and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol*. 1986;23(4):687–90.
 279. Jenney AW, Clements A, Farn JL, Wijburg OL, McGlinchey A, Spelman DW, et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in an Australian tertiary hospital and its implications for vaccine development. *J Clin Microbiol*. 2006 Jan;44(1):102–7.
 280. Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: Risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med*. 2002 May 13;162(9):1021–7.
 281. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al.

- Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb genomics*. 2016 Dec 1;2(12):e000102.
282. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep*. 2015 Oct 23;5.
 283. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb genomics*. 2016 Aug 1;2(8):e000073.
 284. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 32, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2019.
 285. Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, Mori M, Kido N, Ito H, et al. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *ompA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun*. 1991;59(6):2043–50.
 286. Nassrf X, Honoré N, Vasselon T, Cole ST, Sansonetti PJ. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *ompA* and *ompB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 1989 Oct 1;3(10):1349–59.
 287. Lai YC, Peng HL, Chang HY. *RmpA2*, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 *cps* gene expression at the transcriptional level. *J Bacteriol*. 2003 Feb;185(3):788–800.
 288. Wacharotayankun R, Arakawa Y, Ohta M, Tanaka K, Akashi T, Mori M, et al. Enhancement of extracapsular polysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae* by *RmpA2*, which shows homology to *NtrC* and *FixJ*. *Infect Immun*. 1993;61(8):3164–74.
 289. Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae ompA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology* [Internet]. 2011 Dec 1;157(12):3446–57. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.050336-0>
 290. Allen P, Hart CA, Saunders JR. Isolation from *Klebsiella* and characterization of two *rca* genes that activate colanic acid capsular biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*. 1987;133(2):331–40.

291. Stout V, Torres-Cabassa A, Maurizi MR, Gutnick D, Gottesman S. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J Bacteriol.* 1991;173(5):1738–47.
292. Lin CT, Wu CC, Chen YS, Lai YC, Chi C, Lin JC, et al. Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology.* 2011 Feb;157(2):419–29.
293. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2016 Jan 29;4(1).
294. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, et al. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 2006 May 15;42(10):1351–8.
295. Lugo JZ, Price S, Miller JE, Ben-David I, Merrill VJ, Mancuso P, et al. Lipopolysaccharide O-antigen promotes persistent murine bacteremia. *Shock.* 2007 Feb;27(2):186–91.
296. Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A, et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid a structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 17;112(46):E6369–78.
297. Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl_1):S18–27.
298. Fang CT, Shih YJ, Cheong CM, Yi WC. Rapid and Accurate Determination of Lipopolysaccharide O-Antigen Types in *Klebsiella pneumoniae* with a Novel PCR-Based O-Genotyping Method. *J Clin Microbiol.* 2016 Mar 1;54(3):666–75.
299. Whitfield C, Richards JC, Perry MB, Clarke BR, MacLean LL. Expression of two structurally distinct D-galactan O antigens in the lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *J Bacteriol.* 1991;173(4):1420–31.
300. Clarke BR, Whitfield C. Molecular cloning of the *rfb* region of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1:K20: The *rfb* gene cluster is responsible for synthesis of the D-galactan I O polysaccharide. *J Bacteriol.* 1992;174(14):4614–21.
301. Sugiyama T, Kido N, Kato Y, Koide N, Yoshida T, Yokochi T. Evolutionary relationship among *rfb* gene clusters synthesizing mannose homopolymer as O-specific polysaccharides in *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Gene.* 1997;198(2 JAN):111–3.

302. Pennini ME, De Marco A, Pelletier M, Bonnell J, Cvitkovic R, Beltramello M, et al. Immune stealth-driven O2 serotype prevalence and potential for therapeutic antibodies against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Commun*. 2017 Dec 1;8(1).
303. Trautmann M, Ruhnke M, Rukavina T, Held TK, Cross AS, Marre R, et al. O-Antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4(5):550–5.
304. Hsieh PF, Wu MC, Yang FL, Chen CT, Lou TC, Chen YY, et al. D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: Implication in vaccine design. *Front Microbiol*. 2014;5(NOV).
305. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive web: User-Friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *J Clin Microbiol*. 2018 Jun 1;56(6):197–215.
306. Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. IRON BINDING PROTEINS AND INFECTION. *Br J Haematol*. 1972 Oct 1;23(4):389–92.
307. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007 Sep;71(3):413–51.
308. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella pneumoniae* during Pneumonia. *MBio*. 2012 Dec 31;3(6).
309. Podschun R, Sievers D, Fischer A, Ullmann U. Serotypes, Hemagglutinins, Siderophore Synthesis, and Serum Resistance of *Klebsiella* Isolates Causing Human Urinary Tract Infections. *J Infect Dis*. 1993 Dec 1;168(6):1415–21.
310. Tarkkanen AM, Allen BL, Williams PH, Kauppi M, Haahtela K, Siitonen A, et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect Immun*. 1992;60(3):1187–92.
311. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol*. 2013 Oct 1;61(5):209–16.
312. Koczura R, Kaznowski A. Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb*

- Pathog. 2003 Nov 1;35(5):197–202.
313. Brock JH, Williams PH, Liceaga J, Wooldridge KG. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun*. 1991;59(9):3185–90.
 314. Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD, Demoll E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: Biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology*. 1999;145(5):1181–90.
 315. Müller SI, Valdebenito M, Hantke K. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella* [Internet]. Vol. 22, *BioMetals*. Springer; 2009. p. 691–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-009-9217-4>
 316. Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis*. 2008 Jun 15;197(12):1717–27.
 317. Bach S, Almeida A, Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Feb 1;183(2):289–94.
 318. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect Immun*. 2011 Aug;79(8):3309–16.
 319. Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun*. 2007 Mar;75(3):1463–72.
 320. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3677–82.
 321. Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med*. 2018 Oct 29;10(1).
 322. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn*

- Microbiol Infect Dis. 2008 Sep 1;62(1):1–6.
323. Vernet V, Philippon A, Madoulet C, Vistelle R, Jaussaud R, Chippaux C. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. FEMS Microbiol Lett. 1995 Jul 1;130(1):51–7.
 324. Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. Gene. 2004 Aug 4;337(1–2):189–98.
 325. Vogels GD, Van Der Drift C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. Vol. 40, Bacteriological Reviews. American Society for Microbiology (ASM); 1976. p. 403–68.
 326. Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. Infect Immun. 2004 Jul;72(7):3783–92.
 327. Yu WL, Fung CP, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Chuang YC. Polymerase chain reaction analysis for detecting capsule serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* causing abscesses of the liver and other sites [1]. Vol. 195, Journal of Infectious Diseases. Oxford Academic; 2007. p. 1235–6.
 328. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2014 Dec 1;52(12):4377–80.
 329. Christie PJ. The Rich Tapestry of Bacterial Protein Translocation Systems. Vol. 38, Protein Journal. Springer New York LLC; 2019. p. 389–408.
 330. Stones DH, Krachler AM. Against the tide: The role of bacterial Adhesion in host colonization. Biochem Soc Trans. 2016 Dec 15;44(6):1571–80.
 331. Whelan R, McVicker G, Leo JC. Staying out or going in? The interplay between type 3 and type 5 secretion systems in adhesion and invasion of enterobacterial pathogens. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–33.
 332. Drobnak I, Braselmann E, Chaney JL, Leyton DL, Bernstein HD, Lithgow T, et al. Of linkers and autochaperones: An unambiguous nomenclature to identify common and uncommon themes for autotransporter secretion. Vol. 95, Molecular Microbiology. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 1–16.
 333. Fan E, Chauhan N, Udatha DBRKG, Leo JC, Linke D. Type V Secretion

- Systems in Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2016 Jan 29;4(1).
334. Leo JC, Grin I, Linke D. Type V secretion: Mechanism(S) of autotransport through the bacterial outer membrane. Vol. 367, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society; 2012. p. 1088–101.
 335. Bernstein HD. Type V Secretion in Gram-Negative Bacteria. *EcoSal Plus*. 2019 Feb 6;8(2).
 336. Leyton DL, Rossiter AE, Henderson IR. From self sufficiency to dependence: Mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. Vol. 10, *Nature Reviews Microbiology*. *Nat Rev Microbiol*; 2012. p. 213–25.
 337. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*. 1987;325(6103):458–62.
 338. Guérin J, Bigot S, Schneider R, Buchanan SK, Jacob-Dubuisson F. Two-partner secretion: Combining efficiency and simplicity in the secretion of large proteins for bacteria-host and bacteria-bacteria interactions. Vol. 7, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. *Frontiers Media S.A.*; 2017. p. 148.
 339. Kajava A V., Cheng N, Cleaver R, Kessel M, Simon MN, Willery E, et al. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol*. 2001;42(2):279–92.
 340. Jacob-Dubuisson F, Loch C, Antoine R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: A thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol*. 2001 Jan 1;40(2):306–13.
 341. Thanassi DG, Stathopoulos C, Karkal A, Li H. Protein secretion in the absence of ATP: The autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of Gram-negative bacteria. Vol. 22, *Molecular Membrane Biology*. *Mol Membr Biol*; 2005. p. 63–72.
 342. Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence* [Internet]. 2017;8(6):959–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858524>
 343. Roy K, Hilliard GM, Hamilton DJ, Luo J, Ostmann MM, Fleckenstein JM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):594–8.

344. Schmitt C, Turner D, Boesl M, Abele M, Frosch M, Kurzai O. A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of *Neisseria meningitidis* to epithelial cells. *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(22):7968–76.
345. Relman DA, Domenighini M, Toumanen E, Rappuoli R, Falkow S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: Nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2637–41.
346. Fournier C, Smith A, Delepelaire P. Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Mol Microbiol.* 2011 Apr;80(1):133–48.
347. Vakevainen M, Greenberg S, Hansen EJ. Inhibition of phagocytosis by *Haemophilus ducreyi* requires expression of the LspA1 and LspA2 proteins. *Infect Immun.* 2003 Oct 1;71(10):5994–6003.
348. Ward CK, Latimer JL, Nika J, Vakevainen M, Mock JR, Deng K, et al. Mutations in the *lspA1* and *lspA2* genes of *Haemophilus ducreyi* affect the virulence of this pathogen in an animal model system. *Infect Immun.* 2003 May 1;71(5):2478–86.
349. Dodd DA, Worth RG, Rosen MK, Grinstein S, van Oers NSC, Hansen EJ. The *haemophilus ducreyi* *lspA1* protein inhibits phagocytosis by using a new mechanism involving Activation of C-terminal src kinase. *MBio.* 2014 May 20;5(3).
350. Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA. Microbiology: Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science* (80-). 2005 Aug 19;309(5738):1245–8.
351. Aoki SK, Diner EJ, De Roodenbeke CTK, Burgess BR, Poole SJ, Braaten BA, et al. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature.* 2010 Nov 18;468(7322):439–42.
352. Gucinski GC, Michalska K, Garza-Sánchez F, Eschenfeldt WH, Stols L, Nguyen JY, et al. Convergent Evolution of the Barnase/EndoU/Colicin/RelE (BECR) Fold in Antibacterial tRNase Toxins. *Structure.* 2019 Nov 5;27(11):1660-1674.e5.
353. Lai Y-C, Lin G-T, Yang S-L, Chang H-Y, Peng H-L. Identification and characterization of KvgAS, a two-component system in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Jan;218(1):121–6.
354. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion

- system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15508–13.
355. Russell AB, Hood RD, Bui NK, Leroux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*. 2011 Jul 21;475(7356):343–9.
 356. Bladergroen MR, Badelt K, Spaink HP. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2003 Jan 1;16(1):53–64.
 357. Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*. 2009 Mar 12;10.
 358. Nguyen VS, Douzi B, Durand E, Roussel A, Cascales E, Cambillau C. Towards a complete structural deciphering of Type VI secretion system. Vol. 49, *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 77–84.
 359. Barbosa VAA, Lery LMS. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. *BMC Genomics*. 2019 Dec 18;20(1):506.
 360. Sarris PF, Zoumadakis C, Panopoulos NJ, Scoulica E V. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. *Infect Genet Evol*. 2011;11(1):157–66.
 361. Lery LMS, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol*. 2014 May 29;12.
 362. Liu L, Ye M, Li X, Li J, Deng Z, Yu-Feng Yao, et al. Identification and characterization of an antibacterial type VI secretion System in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Oct 12;7(OCT).
 363. Sexton JA, Miller JL, Yoneda A, Kehl-Fie TE, Vogel JP. *Legionella pneumophila* dotU and icmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):5983–92.
 364. Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* Type VI Secretion System 1 Is Activated in Marine Conditions to Target Bacteria,

- and Is Differentially Regulated from System 2. PLoS One. 2013 Apr 16;8(4).
365. Suarez G, Sierra JC, Erova TE, Sha J, Horneman AJ, Chopra AK. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. J Bacteriol. 2010 Jan;192(1):155–68.
 366. Zhou M, Lan Y, Wang S, Liu Q, Jian Z, Li Y, et al. Epidemiology and molecular characteristics of the type VI secretion system in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. J Clin Lab Anal. 2020 Nov 1;34(11).
 367. Hsieh PF, Lu YR, Lin TL, Lai LY, Wang JT. *Klebsiella pneumoniae* Type VI Secretion System Contributes to Bacterial Competition, Cell Invasion, Type-1 Fimbriae Expression, and in Vivo Colonization. J Infect Dis. 2019 Jan 29;219(4):637–47.
 368. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cell Microbiol. 2007 Sep;9(9):2230–41.
 369. Nuccio S-P, Bäumlér AJ. Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek. Microbiol Mol Biol Rev. 2007 Dec;71(4):551–75.
 370. Zav'yalov VP, Zav'yalova GA, Denesyuk AI, Korpela T. Modelling of steric structure of a periplasmic molecular chaperone Caf1M of *Yersinia pestis*, a prototype member of a subfamily with characteristic structural and functional features. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995 Mar;11(1):19–24.
 371. Hung DL, Knight SD, Woods RM, Pinkner JS, Hultgren SJ. Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. EMBO J. 1996 Aug 1;15(15):3792–805.
 372. Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: Diversity and pilus assembly mechanism. Vol. 367, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2012. p. 1112–22.
 373. Lillington J, Geibel S, Waksman G. Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. Vol. 1840, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. Elsevier; 2014. p. 2783–93.
 374. Khater F, Balestrino D, Charbonnel N, Dufayard JF, Brisse S, Forestier C. In silico analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. PLoS One.

- 2015;10(3).
375. Wu CC, Huang YJ, Fung CP, Peng HL. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology*. 2010;156(7):1983–92.
 376. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4055–65.
 377. Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, Weissman SJ, Chattopadhyay S, Yakovenko O, et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2009 Nov;191(21):6592–601.
 378. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes A V., Abraham SN, et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):2081–5.
 379. Gerlach GF, Clegg S, Allen BL. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1989;171(3):1262–70.
 380. Rosen DA, Hilliard JK, Tiemann KM, Todd EM, Morley SC, Hunstad DA. *Klebsiella pneumoniae* FimK promotes virulence in murine pneumonia. *J Infect Dis*. 2016 Feb 15;213(4):649–58.
 381. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. Vol. 5, Cell Host and Microbe. Elsevier; 2009. p. 580–92.
 382. Firon N, Ofek I, Sharon N. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of Enterobacteria. *Infect Immun*. 1984;43(3):1088–91.
 383. Maayan MC, Ofek I, Medalia O, Aronson M. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect Immun*. 1985;49(3):785–9.
 384. Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA, Reisner A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):350–9.
 385. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun*.

- 2009;77(11):5016–24.
386. Hornick DB, Thommandru J, Smits W, Clegg S. Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1995;63(5):2026–32.
 387. Huang YJ, Liao HW, Wu CC, Peng HL. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol*. 2009 Jan;160(1):71–9.
 388. Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1991;173(2):916–20.
 389. Johnson JG, Murphy CN, Sippy J, Johnson TJ, Clegg S. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2011 Jul;193(14):3453–60.
 390. Yang J, Wilksch JJ, Tan JWH, Hocking DM, Webb CT, Lithgow T, et al. Transcriptional activation of the mrkA promoter of the *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein. *PLoS One*. 2013 Nov 14;8(11).
 391. Tan JWH, Wilksch JJ, Hocking DM, Wang N, Srikhanta YN, Tauschek M, et al. Positive autoregulation of mrkHI by the cyclic Di-GMP-dependent MrkH protein in the biofilm regulatory circuit of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2015;197(9):1659–67.
 392. Wilksch JJ, Yang J, Clements A, Gabbe JL, Short KR, Cao H, et al. MrKH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog*. 2011 Aug;7(8).
 393. Wu CC, Lin CT, Cheng WY, Huang CJ, Wang ZC, Peng HL. Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology*. 2012 Apr;158(4):1045–56.
 394. Johnson JG, Clegg S. Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2010 Aug;192(15):3944–50.
 395. Schurtz Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun*. 1998;66(6):2887–94.
 396. Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella*

- pneumoniae, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun*. 2001;69(9):5805–12.
397. Hornick DB, Allen BL, Horn MA, Clegg S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun*. 1992;60(4):1577–88.
 398. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine N, De la Cruz MA, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella Pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):129–38.
 399. Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, Joly B, Darfeuille-Michaud A, Livrelli R, et al. A New Fimbrial Antigen Harbored by CAZ-5/SHV-4-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Involved in Nosocomial Infections. Vol. 64, *INFECTION AND IMMUNITY*. 1996.
 400. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*. 2016;1(5):e00261-16.
 401. Dorman MJ, Short FL. Genome watch: *Klebsiella pneumoniae*: When a colonizer turns bad. Vol. 15, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 1.
 402. Tischendorf J, De Avila RA, Safdar N. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *Am J Infect Control*. 2016 May 2;44(5):539–43.
 403. Bilavsky E, Schwaber MJ, Carmeli Y. How to stem the tide of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae?: Proactive versus reactive strategies. Vol. 23, *Current Opinion in Infectious Diseases*. *Curr Opin Infect Dis*; 2010. p. 327–31.
 404. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect*. 2010 Apr;74(4):344–9.
 405. Calfee D, Jenkins SG. Use of Active Surveillance Cultures to Detect Asymptomatic Colonization With Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Unit Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 Oct;29(10):966–8.
 406. Durante-Mangoni E, Andini R, Zampino R. Management of carbapenem-

- resistant Enterobacteriaceae infections [Internet]. *Clinical Microbiology and Infection* Elsevier B.V.; Aug 1, 2019 p. 943–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.013>
407. CDC. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Update-CRE Toolkit. 2015.
 408. Catho G, Huttner BD. Strategies for the eradication of extended-spectrum beta-lactamase or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae intestinal carriage [Internet]. Vol. 17, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 26]. p. 557–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31313610/>
 409. Tschudin-Sutter S, Lucet JC, Mutters NT, Tacconelli E, Zahar JR, Harbarth S. Contact Precautions for Preventing Nosocomial Transmission of Extended-Spectrum β Lactamase-Producing *Escherichia coli*: A Point/Counterpoint Review. Vol. 65, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2017. p. 342–7.
 410. Oren I, Sprecher H, Finkelstein R, Hadad S, Neuberger A, Hussein K, et al. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. *Am J Infect Control*. 2013 Dec;41(12):1167–72.
 411. Lübbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers UX, Ducomble T, Eckmanns T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control*. 2014;42(4):376–80.
 412. Seale J V., Millar M. Probiotics: A new frontier for infection control. Vol. 84, *Journal of Hospital Infection*. J Hosp Infect; 2013. p. 1–4.
 413. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;371(9613):651–9.
 414. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. Vol. 13, *Expert Opinion on Drug Safety*. Expert Opin Drug Saf; 2014. p. 227–39.
 415. Saïdani N, Lagier JC, Cassir N, Million M, Baron S, Dubourg G, et al. Faecal microbiota transplantation shortens the colonisation period and allows re-entry

- of patients carrying carbapenamase-producing bacteria into medical care facilities. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Apr 1;53(4):355–61.
416. Dinh A, Fessi H, Duran C, Batista R, Michelon H, Bouchand F, et al. Clearance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae vs vancomycin-resistant enterococci carriage after faecal microbiota transplant: a prospective comparative study. *J Hosp Infect*. 2018 Aug 1;99(4):481–6.
 417. Davido B, Batista R, Michelon H, Lepointeur M, Bouchand F, Lepeule R, et al. Is faecal microbiota transplantation an option to eradicate highly drug-resistant enteric bacteria carriage? *J Hosp Infect*. 2017 Apr 1;95(4):433–7.
 418. Mahieu R, Cassisa V, Sanderink D, Chenouard R, Pailhoriès H, Kempf M, et al. Iterative fecal microbiota transplantations for eradicating digestive colonization with carbapenemase-producing enterobacteriaceae: Is it worth it? Vol. 38, *Infection Control and Hospital Epidemiology*. Cambridge University Press; 2017. p. 1265–6.
 419. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, Allerberger F, Bouza E, Coia JE, et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(S2):1–26.
 420. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Vol. 66, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2018. p. e1–48.
 421. FDA. Important Safety Alert Regarding Use of Fecal Microbiota for Transplantation and Risk of Serious Adverse Reactions Due to Transmission of Multi-Drug Resistant Organisms | FDA [Internet]. FDA Safety & Availability (Biologics). 2019. p. 1. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/important-safety-alert-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation-and-risk-serious-adverse>
 422. Manges AR, Steiner TS, Wright AJ. Fecal microbiota transplantation for the intestinal decolonization of extensively antimicrobial-resistant opportunistic pathogens: A review. Vol. 48, *Infectious Diseases*. Taylor and Francis Ltd.; 2016. p. 587–92.
 423. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine

- T, et al. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Jul 1;25(7):830–8.
424. Davido B, Salomon J, Lawrence C, Duran C, Batista R, De Truchis P, et al. Impact of Fecal Microbiota Transplantation for Decolonization of Multidrug-Resistant Organisms May Vary According to Donor Microbiota. Vol. 66, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2018. p. 1316–7.
 425. Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, Bragantini D, Eggimann P, Huttner BD, et al. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. Vol. 25, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2019. p. 807–17.
 426. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae-8 April 2016. Stockholm. Ecdc. 2016;
 427. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. Vol. 33, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2020.
 428. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):559–62.
 429. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: Nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Vol. 7, *Future Microbiology*. 2012. p. 991–1002.
 430. Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect Immun.* 2008;76(7):3346–56.
 431. Favre-Bonte S, Darfeuille-Michaud A, Forestier C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect Immun.* 1995;63(4):1318–28.
 432. Darfeuille-Michaud A, Jallat C, Aubel D, Sirot D, Rich C, Sirot J, et al. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect Immun.* 1992;60(1):44–55.
 433. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 9, *Future Microbiology*. 2014. p. 1071–81.

434. Álvarez-Fraga L, Vázquez-Ucha JC, Martínez-Gutián M, Vallejo JA, Bou G, Beceiro A, et al. Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *acinetobacter baumannii*. *Virulence* [Internet]. 2018;9(1):496–509. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29334313>
435. Porse A, Gumpert H, Kubicek-Sutherland JZ, Karami N, Adlerberth I, Wold AE, et al. Genome dynamics of *Escherichia coli* during antibiotic treatment: Transfer, loss, and persistence of genetic elements in situ of the infant gut. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(APR).
436. Melvin JA, Scheller E V., Noël CR, Cotter PA. New insight into filamentous hemagglutinin secretion reveals a role for full-length *FhaB* in *Bordetella* virulence. *MBio*. 2015 Jul 18;6(4).
437. Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A. *HecA*, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13142–7.
438. St. Geme JW, Yeo HJ. A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. Vol. 17, *Trends in Microbiology*. Trends Microbiol; 2009. p. 355–60.
439. Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. Vol. 1694, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Biochim Biophys Acta; 2004. p. 235–57.
440. Yu F, Lv J, Niu S, Du H, Tang YW, Pitout JDD, et al. Multiplex PCR analysis for rapid detection of *klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistant (sequence type 258 [ST258] and ST11) and hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. *J Clin Microbiol*. 2018 Sep 1;56(9):731–49.
441. Monstein HJ, Östholm-Balkhed Å, Nilsson M V., Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS*. 2007 Dec 1;115(12):1400–8.
442. Gupta K, Chou MY, Howell A, Wobbe C, Grady R, Stapleton AE. Cranberry Products Inhibit Adherence of P-Fimbriated *Escherichia Coli* to Primary Cultured Bladder and Vaginal Epithelial Cells. *J Urol*. 2007 Jun;177(6):2357–

60.

443. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Gowda GAN, Khetrpal CL, Bhandari M. Inhibition of adherence of multi-drug resistant *E. coli* by proanthocyanidin. *Urol Res*. 2012 Apr;40(2):143–50.
444. Samarasinghe S, Reid R, Al-Bayati M. The anti-virulence effect of cranberry active compound proanthocyanins (PACs) on expression of genes in the third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* CTX-M-15 associated with urinary tract infection. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Nov 20;8(1).
445. Ballester FS, Vidal VR, López Alcina E, Domenech Perez C, Escudero Fontano E, Oltra Benavent AM, et al. Cysticlean® a highly pac standardized content in the prevention of recurrent urinary tract infections: An observational, prospective cohort study. *BMC Urol*. 2013;13:28.
446. Singh I, Gautam LK, Kaur IR. Effect of oral cranberry extract (standardized proanthocyanidin-A) in patients with recurrent UTI by pathogenic *E. coli*: a randomized placebo-controlled clinical research study. *Int Urol Nephrol*. 2016 Sep 1;48(9):1379–86.
447. Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) Using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2001 [cited 2021 Jun 20];49(3):1270–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11312849/>
448. METIVIER RP, FRANCIS FJ, CLYDESDALE FM. SOLVENT EXTRACTION OF ANTHOCYANINS FROM WINE POMACE. *J Food Sci*. 1980 Jul 1;45(4):1099–100.
449. Lončarić A, Celeiro M, Jozinović A, Jelinić J, Kovač T, Jokić S, et al. Green extraction methods for extraction of polyphenolic compounds from blueberry pomace. *Foods*. 2020 Oct 23;9(11).
450. Rue EA, Rush MD, van Breemen RB. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. Vol. 17, *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands; 2018. p. 1–16.
451. Howell AB. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. Vol. 51, *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007. p. 732–7.
452. De Llano DG, Esteban-Fernández A, Sánchez-Patán F, Martín-Álvarez PJ,

- Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. Anti-adhesive activity of cranberry phenolic compounds and their microbial-derived metabolites against uropathogenic *Escherichia coli* in bladder epithelial cell cultures. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):12119–30.
453. Ulrey RK, Barksdale SM, Zhou W, Van Hoek ML. Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1).
 454. Rodríguez-Pérez C, Quirantes-Piné R, Uberos J, Jiménez-Sánchez C, Peña A, Segura-Carretero A. Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food Funct*. 2016 Mar 1;7(3):1564–73.
 455. Sun J, Marais JPJ, Khoo C, LaPlante K, Vejborg RM, Givskov M, et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Funct Foods*. 2015 Aug 1;17:235–42.
 456. Salaheen S, Jaiswal E, Joo J, Peng M, Ho R, O'Connor D, et al. Bioactive extracts from berry byproducts on the pathogenicity of *Salmonella Typhimurium*. *Int J Food Microbiol*. 2016;237:128–35.
 457. Burger O, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I, Ofek I. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. Vol. 42, *Critical reviews in food science and nutrition*. 2002. p. 279–84.
 458. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. Vol. 50, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2011. p. 586–621.
 459. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM. Bioactive berry compounds - Novel tools against human pathogens. Vol. 67, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. p. 8–18.
 460. Scharf B, Schmidt TJ, Rabbani S, Stork C, Dobrindt U, Sendker J, et al. Antiadhesive natural products against uropathogenic *E. coli*: What can we learn from cranberry extract? *J Ethnopharmacol*. 2020 Jul 15;257:112889.
 461. Wang H, Chu W, Ye C, Gaeta B, Tao H, Wang M, et al. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by regulating quorum sensing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Jan

18;103(2):903–15.

462. Ramirez-Hernandez A, Rupnow J, Hutkins RW. Adherence reduction of campylobacter jejuni and campylobacter coli strains to HEp-2 cells by mannan oligosaccharides and a high-molecular-weight component of cranberry extract. *J Food Prot.* 2015;78(8):1496–505.
463. Hotchkiss AT, Nuñez A, Strahan GD, Chau HK, White AK, Marais JPJ, et al. Cranberry Xyloglucan Structure and Inhibition of Escherichia coli Adhesion to Epithelial Cells. *J Agric Food Chem.* 2015;63(23):5622–33.
464. Coddens A, Loos M, Vanrompay D, Remon JP, Cox E. Cranberry extract inhibits in vitro adhesion of F4 and F18 + Escherichia coli to pig intestinal epithelium and reduces in vivo excretion of pigs orally challenged with F18 + verotoxigenic E. coli. *Vet Microbiol.* 2017;202:64–71.

CVA



Fecha del CVA	28/06/2021
---------------	------------

Parte A. DATOS PERSONALES

Nombre y Apellidos	Eva Gato Corral		
DNI	33547549W	Edad	35
Núm. identificación del investigador	Researcher ID		
	Scopus Author ID		
	* Código ORCID	0000-0002-1662-514X	

* Obligatorio

A.1. Situación profesional actual

Organismo	FUNDACION PROFESOR NOVOA SANTOS		
Dpto. / Centro	Unidad de Investigación Microbiología / Instituto de Investigación Biomédica A Coruña		
Dirección	Hospital Universitario A Coruña Servicio de Microbiología 3º Planta Edificio Sur, As Xubias s/n, 15006, A Coruña		
Teléfono	(0034) 659572226	Correo electrónico	eva.gato@hotmail.com
Categoría profesional	Investigador	Fecha inicio	2011
Palabras clave			

A.2. Formación académica (título, institución, fecha)

Licenciatura/Grado/Doctorado	Universidad	Año
Máster en Ensayos Clínicos	Universidad San Pablo CEU / CESIF	2020
Máster Universitario en Asistencia e Investigación Sanitaria	Universidade de A Coruña	2012
Licenciado en Biología Especialidad Biología Sanitaria	Universidad de Oviedo	2009

A.3. Indicadores generales de calidad de la producción científica

Número total de citas: 414

Índice h: 7

Índice i10: 7

Publicaciones totales: 17

Primer/co-primer autor: 7

Comunicaciones a congresos: 19

Índices de impacto y cuartil/decil de las revistas más destacadas en las que he publicado:
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A: 9.412 (Q1), J Med Chem: 6.205 (D1), J Clin Microbiol: 5.897 (Q1), JAntimicrob Chemother: 5.439 (D1)

Parte B. RESUMEN LIBRE DEL CURRÍCULUM

Realización de la Tesis Doctoral en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de A Coruña bajo la supervisión del Dr. Germán Bou y la Dra. Astrid Pérez. Experiencia en técnicas de Microbiología y Biología Molecular y Celular entre las que se encuentran la secuenciación de genomas bacterianos (Roche 454, Illumina y MinION), el procesamiento de los datos obtenidos y estudios genotípicos y fenotípicos de resistencia y virulencia microbianos utilizando, en algunos casos, líneas celulares eucariotas. Estudios de expresión génica y proteica bacteriana mediante RT-PCR y MALDI-TOF. Destacar la coautoría en 17 publicaciones científicas, 10 de ellas en revistas de primer decil/cuartil, siendo autor principal o

co-primer autor en 7 de ellas. Coautoría en 19 comunicaciones a congresos, tanto nacionales como internacionales, y participación en 8 proyectos de investigación, tanto de financiación pública como privada, coordinados por los investigadores Dr. Germán Bou, Dra. Margarita Poza, Dr. Alejandro Beceiro, Dra. María del Mar Tomás, Dra. Astrid Pérez y Dra. Marina Oviaño cuya suma total asciende a más de 1.000.000 de euros.

Los artículos marcados con un "*" señalan aquellos artículos donde soy primer/co-primer autor.

Parte C. MÉRITOS MÁS RELEVANTES (ordenados por tipología)

C.1. Publicaciones

AC: Autor de correspondencia; (nº x / nº y): posición firma solicitante / total autores

- 1 Gato E; Constanso IP; Candela A; et al; Oviaño M. 2021. *An improved MALDI-TOF MS data analysis pipeline for the identification of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Journal of clinical microbiology. ISSN 0095-1137.
- 2 Gato E; Constanso IP; Rodiño-Janeiro BK; et al; Oviaño M. 2021. *Occurrence of the *pO19* gene in the *bla* _{KPC}-harbouring plasmids: adverse clinical impact for direct tracking of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. Journal of clinical microbiology. ISSN 0095-1137.
- 3 Vázquez-Ucha JC; Rodríguez D; Lasarte-Monterrubio C; et al; Beceiro A. 2021. 6-Halopyridylmethylidene Penicillin-Based Sulfones Efficiently Inactivate the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to β -Lactam Antibiotics. Journal of medicinal chemistry. 64, pp.6310-6328. ISSN 0022-2623.
- 4 Gato E; Rosalowska A; Martínez-Gutián M; Lores M; Bou G; Pérez A. 2020. *Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 132, pp.110885. ISSN 0753-3322.
- 5 Gato E; Vázquez-Ucha JC; Rumbo-Feal S; et al; Pérez A. 2020. *Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 117, pp.17249-17259. ISSN 0027-8424.
- 6 Oviaño M; Gato E; Bou G. 2020. Rapid Detection of KPC-Producing Enterobacterales Susceptible to Imipenem/Relebactam by Using the MALDI-TOF MS MBT STAR-Carba IVD Assay. Frontiers in microbiology. 11, pp.328.
- 7 Pérez A; Gato E; Pérez-Llarena J; et al; Bou G. 2019. *High incidence of MDR and XDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 74, pp.1244-1252. ISSN 0305-7453.
- 8 Gato E; Álvarez-Fraga L; Vallejo JA; et al; Pérez A. 2018. *Draft Genome Sequences of Two Epidemic OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Isolated during a Large Outbreak in Spain. Genome announcements. 6.
- 9 López M; Blasco L; Gato E; et al; Tomás M. 2017. Response to Bile Salts in Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii* Lacking the AdeABC Efflux Pump: Virulence Associated with Quorum Sensing. Frontiers in cellular and infection microbiology. 7, pp.143.
- 10 Garnacho-Montero J; Gutiérrez-Pizarra A; Díaz-Martín A; et al; Rodríguez-Baño J. 2016. *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: Molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 34, pp.551-558. ISSN 0213-005X.
- 11 Barbosa BG; Fernández-García L; Gato E; et al; Tomás M. 2016. Genome Sequence of Airborne *Acinetobacter* sp. Strain 5-2Ac02 in the Hospital Environment, Close to the Species of *Acinetobacter towneri*. Genome announcements. 4.
- 12 López M; Álvarez-Fraga L; Gato E; Blasco L; Poza M; Fernández-García L; Bou G; Tomás M. 2016. Genome Sequence of a Clinical Strain of *Acinetobacter baumannii* Belonging to the ST79/PFGE-HUI-1 Clone Lacking the AdeABC (Resistance-Nodulation-Cell Division-Type) Efflux Pump. Genome announcements. 4.

- 13 López M; Rueda A; Florido JP; et al; Tomás M. 2016. Genomic Evolution of Two *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains from ST-2 Clones Isolated in 2000 and 2010 (ST-2_clon_2000 and ST-2_clon_2010). *Genome announcements*. 4.
- 14 Mosqueda N; Gato E; Roca I; et al; GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI. 2014. *Characterization of plasmids carrying the blaOXA-24/40 carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 69, pp.2629-33. ISSN 0305-7453.
- 15 Villar M; Cano ME; Gato E; et al; GEIHGEMARAREIPI-Ab20101 Group. 2014. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. *Medicine*. 93, pp.202-210. ISSN 0025-7974.
- 16 Rumbo C; Gato E; López M; et al; Spanish Network for Research in Infectious Diseases(REIPI). 2013. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 57, pp.5247-57. ISSN 0066-4804.
- 17 Espinal P; Macià MD; Roca I; et al; Vila J. 2012. First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to Tn2006 in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 57, pp.589-91. ISSN 0066-4804.

C.2. Proyectos

- 1 Estudio del proteoma bacteriano mediante espectrometría de masas MALDI-TOF como técnica rápida para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Marina Oviaño García. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). 01/10/2019-01/10/2021. 100.000 €. Contratado a cargo de proyecto.
- 2 Comparative study of the microbiological activity of IMI-REL with respect to CAZ-AVI: dynamics of the appearance of resistance, Mutant Preventive Concentration (MPC) and activity of IMI-REL against KPC-type carbapenemase variants resistant to CAZ-AVI through mutations into omega-loop. Merck Sharp & Dohme España, S.A. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). 01/06/2020-30/06/2021.
- 3 Evaluación de nuevas estrategias antimicrobianas mediante silenciamiento de ARN vehiculizado en nanocápsulas e inhibidores enzimáticos. Instituto de Salud Carlos III. Alejandro Beceiro Casas. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). 01/01/2018-31/12/2020. 123.420 €.
- 4 Terapia FÁGICA CLÍNICA: Nuevos retos Instituto de Salud Carlos III. María del Mar Tomás Carmona. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). 01/01/2017-31/12/2019. 110.715 €.
- 5 Estudio de los mecanismos implicados en la colonización y epidemidad del patógeno nosocomial *K. pneumoniae*: búsqueda de nuevas estrategias para erradicar una infección. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). 01/09/2016-31/08/2018. 100.900 €.
- 6 Combating Antibiotic Resistance: NewDrugs4BadBugs (ND4BB) IMI 6th European Commission-EFPIA (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations). Germán Bou. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). 2013-2015.
- 7 Monitorización del virus SARS-CoV-2 en las instalaciones gestionadas por Edar Bens S.A. Edar Bens, S.A.. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). Desde 01/04/2020.
- 8 Identification of the mode of action (bactericidal vs bacteriostatic) activity of different ABAC-compounds against of *Acinetobacter baumannii*. ABAC THERAPEUTICS. (Hospitalario Universitario A Coruña (HUAC)/ Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC)). Desde 01/12/2014.